ESTUDIOS EN RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Autores:

Adriana María Correa Bermúdez
Elsa De La Cadena Vivas
Ruth Rojas
Aura Falco
Carlos Andrés Aranaga
Guillermina Alonso
Marcela Perenguez Verdugo

VIGILADA MINEDUCACION

USC UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI

EDITORIAL

Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas

Adriana María Correa Bermúdez
Elsa de la Cadena Vivas
Ruth Rojas
Aura Falco
Carlos Andrés Aranaga
Guillermina Alonso
Marcela Perenguez Verdugo

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

CORREA BERMÚDEZ, A. M., DE LA CADENA VIVAS, E., ROJAS, R., FALCO, A., ARANAGA, C. A., ALONSO, G., and PERENGUEZ VERDUGO, M. *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas* [online]. Santiago de Cali: Editorial USC, 2021, 132 p. ISBN: 978-958-5583-92-4. Available from: https://books.scielo.org/id/t755k. https://doi.org/10.35985/9789585583924.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribição 4.0.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimento 4.0.

USC
UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
EDITORIAL

Para citar este libro

Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2021). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas*. Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

Palabras Clave / Keywords

Resistencia, Beta-lactámicos, Beta-lactamasas, *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Bacterias Gram negativas*.

Resistance, Beta-lactams, Beta-lactamases, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Gram negative bacteria*.

Contenido relacionado:

https://investigaciones.usc.edu.co/

ESTUDIOS EN RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Autores: Adriana María Correa Bermúdez
Elsa De La Cadena Vivas
Ruth Rojas
Aura Falco
Carlos Andrés Aranaga
Guillermina Alonso
Marcela Perenguez Verdugo

VIGILADA MINEDUCACIÓN
USC UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
EDITORIAL

Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas / Adriana María Correa Bermúdez [y otros]. --
Cali : Universidad Santiago de Cali, 2021.
132 páginas : fotografías ; 24 cm.

ISBN: 978-958-5583-91-7
ISBN (Libro digital): 978-958-5583-92-4

1. Microbiología médica 2. Antibióticos lactámicos 3. Resistencia antibiótica 4. Resistencia a las drogas I. Correa Bermúdez, Adriana María, 1983- , autora II. Cadena Vivas, Elsa De La, 1979- , autora III. Rojas, Ruth, 1980- , autora IV. Falco, Aura, 1992- , autora.
616.01 cd 22 ed.
A1661235

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arango

VIGILADA MINEDUCACIÓN
USC UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
EDITORIAL

Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas

© Universidad Santiago de Cali.

© **Autores:** Adriana Correa, Elsa De La Cadena, Ruth Rojas, Aura Falco, Carlos Aranaga, Guillermina Alonso y Marcela Perenguez.

Edición 100 ejemplares

Cali, Colombia - 2021

Comité Científico / Scientific Committee
Rosa del Pilar Cogua Romero
Doris Lilia Andrade Agudelo
Edward Javier Ordóñez
Luisa María Nieto Ramírez
Sergio Molina Hincapié
Milton Orlando Sarria Paja
Sergio Antonio Mora Moreno
Claudia Fernanda Giraldo Jiménez
Luis Felipe Vélez Franco

Proceso de arbitraje doble ciego:
"Double blind" peer-review

Recepción/Submission:
Agosto (August) de 2020

Evaluación de contenidos/Peer-review outcome:
October (October) de 2020

Aprobación/Acceptance:
Noviembre (November) de 2020

La editorial de la Universidad Santiago de Cali se adhiere a la filosofía de acceso abierto. Este libro está licenciado bajo los términos de la Atribución 4.0 de Creative Commons (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite el uso, el intercambio,adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre y cuando se dé crédito al autor o autores originales y a la fuente https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

CONTENIDO

Pág.

Introducción 7

Capítulo 1

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS
Adriana Correa
Elsa De La Cadena.....11

Capítulo 2

IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE Acinetobacter baumannii PROVENIENTES DE PACIENTES CON INFECCIONES NOSOCOMIALES Y DISPOSITIVOS TIPO CATÉTER EN VENEZUELA
Ruth Rojas
Aura Falco
Carlos Aranaga
Guillermina Alonso 35

Capítulo 3

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A COMBINACIONES DE BETA-LACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS EN COLOMBIA
Adriana Correa
Elsa De La Cadena 63

Capítulo 4

DISEMINACIÓN DE CLONES DE ALTO RIESGO EN Klebsiella pneumoniae PORTADORA DE CARBAPENEMASA TIPO KPC EN COLOMBIA

Adriana Correa

Marcela Perenguez 87

Acerca de los Autores..... 123

Pares Evaluadores.....128

Introducción

Los grupos de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA) y en Química y Biotecnología (QUIBIO) hacen parte del Centro de Estudios e Investigaciones en Ciencias Básicas Ambientales y Desarrollo Tecnológico (CICBA), adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali. Desde su comienzo esta unidad académico-administrativa ha procurado estar a la vanguardia en la investigación, en la tecnología y en la innovación. Es por ello que los grupos de investigación acordes con esta macrolínea se han preocupado por compartir sus avances en investigación e innovación en un marco de responsabilidad social. Es por ello que, en este libro llamado "*Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas"*, se recopilan tres trabajos de investigadores que forman parte de la producción intelectual de los grupos GIMIA y QUIBIO, en alianza con el Grupo de Resistencia y Epidemiología Hospitalaria (RAEH) de la Universidad El Bosque. En este libro se dan a conocer estudios realizados tanto en Colombia como en Venezuela sobre la problemática global relacionada con la resistencia bacteriana a una de las familias de antibióticos más usadas en la práctica clínica, los beta-lactámicos.

En el primer capítulo, la Dra. Correa y la *MSc.* De La Cadena hacen una descripción de los mecanismos de resistencia a antibióticos haciendo énfasis en los beta-lactámicos. Para facilitar la comprensión del lector a lo largo del libro, se aborda el tema de la producción y de la clasificación de las enzimas beta-lactamasas, las cuales son capaces de inactivar estos antibióticos de amplio espectro. Abordar este tema es de suma importancia debido a que la resistencia a antibióticos es un problema global que se ha ido incrementado en los últimos años a nivel mundial. Lamentablemente, países como Colombia y Venezuela no escapan a esta realidad por lo que éste se ha vuelto un desafío importante para

los laboratorios clínicos de microbiología y los centros de salud que están comprometidos a mejorar su detección para aplicar un tratamiento adecuado a las infecciones hospitalarias y comunitarias que causan las bacterias resistentes a estos antibióticos.

En el segundo capítulo, la Dra. Aura Falco, el *MSc*. Carlos Aranaga y colaboradores, presentan los resultados de un estudio en el que se realizó la identificación y la genotipificación de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* portadores del gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$ en Venezuela. Los autores de este capítulo hicieron un estudio de epidemiología molecular de cepas resistentes a antibióticos aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales y con dispositivos tipo catéter. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la importancia que tienen los estudios epidemiológicos para apoyar sistemas de vigilancia, permitiendo el establecimiento de medidas adecuadas de prevención en la diseminación de estos patógenos de importancia clínica.

En el tercer capítulo, la Dra. Correa y la *MSc*. De La Cadena caracterizaron los mecanismos que estaban contribuyendo a la resistencia a las combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas en aislamientos de *Enterobacterales* en Colombia. Los resultados mostraron que el fenotipo de resistencia a los inhibidores estaba asociado a mecanismos como la hiper-expresión de bla_{TEM} o bla_{SHV}, la presencia de $bla_{\text{OXA-1}}$ o $bla_{\text{KPC.}}$

En el último capítulo, la Dra. Correa y la *MSc*. Marcela Perenguez, hacen un estudio de la diseminación de clones de alto riesgo en *Klebsiella pneumoniae* portadora de carbapenemasa tipo KPC en Colombia. Este trabajo es muy relevante debido a que *K. pneumoniae* es una de las principales bacterias causantes de infecciones asociadas con la atención en salud en Colombia, cuya diseminación exitosa está asociada con clones de alto riesgo. Los resultados reportados aquí indican que, desde el punto

de vista genético, los aislados circulantes en el país son muy diversos y portan las variantes *bla*$_{KPC-2}$ y *bla*$_{KPC-3}$, que, a su vez, se encuentran en una gran diversidad de plásmidos.

En la actualidad existe una gran preocupación por la emergencia, selección y diseminación de bacterias resistentes a beta-lactámicos. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud ha publicado una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las bacterias que forman parte de los estudios que se han reportado en los diferentes capítulos de este libro. Esta lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación de esta problemática y promover la búsqueda mancomunada de alternativas que permitan controlar y combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos. Es por ello que se espera que este libro sea un aporte para la solución de la problemática que aquí se describe.

Aura Falco,
Profesora Titular de la Universidad Santiago de Cali.

CAPÍTULO 1

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS

Adriana María Correa Bermúdez*

https://orcid.org/0000-0003-2024-6975

Elsa De La Cadena Vivas**

https://orcid.org/0000-0003-0361-7893

La resistencia microbiana ha sido considerada como una amenaza para la salud pública a nivel mundial. Entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés: *Centers for Desease Control and prevention*) establecieron la lucha contra la resistencia antimicrobiana como una de sus prioridades (CDC, 2020). La selección de microorganismos resistentes a los antimicrobianos es

* Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ adriana.corea@usc.edu.co

** Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia
✉ ecadenav@unbosque.edu.co

Para citar este capítulo:

Correa Bermúdez, A. y De La Cadena Vivas, E. Resistencia bacteriana a los antibióticos beta-lactámicos. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2021). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas.* (pp. 11-34). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

cada día más común debido, entre otros, al uso de antibióticos de mayor espectro y hospitalizaciones prolongadas que generan mayores tasas de morbi-mortalidad. La resistencia microbiana se ha reportado a todo nivel, bacterias, hongos, virus y parásitos (Septimus, 2018).

En el caso de la resistencia en bacterias, ésta se ha clasificado según su perfil fenotípico como multidrogorresistencia o MDR (por sus siglas en inglés *Multi-drug Resistance*), resistencia extendida o XDR (por sus siglas en inglés *Extended Drug Resistance*) y pan-resistente PDR (por sus siglas en inglés *Pan-drug Resistance*) para caracterizar los diferentes patrones de resistencia. Se han utilizado múltiples definiciones sobre esta terminología, sin embargo, en el año 2011, los grupos del ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) y el CDC crearon una clasificación internacional para *Staphylococcus aureus*, Enterobacterales (no incluidas *Salmonella* y *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., (ver tabla 1) (Magiorakos et al., 2012).

Tabla 1. Categoría de antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR en bacterias Gram negativas

Enterobacterales	***Acinetobacter spp***
Aminoglucósidos (Gentamicina/ Tobramicina/Amikacina/ Netilmicina)	**Aminoglucósidos** (Gentamicina/Tobramicina/ Amikacina/Netilmicina)
Anti- MRSA cefalosporinas (Ceftarolina)	**Carbapenems** (Imipenem/ Meropenem/ Doripenem)
Penicilinas+inhibidores de B-lactamasas antipseudomonas (Ticarcilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-Tazobactam)	**Fluoroquinolonas Antipseudomonas** (Ciprofloxacina/ Levofloxacina)

Carbapenems (Ertapenem/Imipenem/ Meropenem/Doripenem)

Cefalosporinas de 1ra y 2da generación (Cefazolina/ Cefuroxima)

Cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (Cefotaxime/ Ceftriaxona/Ceftazidima/ Cefepime)

Cefamicinas (Cefoxitin/Cefotetan)

Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)

Inhibidores de Folatos - Trimetoprima-sulfametoxazol)

Glicilciclinas-(Tigeciclina)

Monobactams - (Aztreonam)

Penicilinas - (Ampicilina)

Penicilinas+inhibidores de B-lactamasas (Amoxacilina-clavulanato/ Ampicilina-sulbactam)

Ácido fosfónico: (Fosfomicina)

Polimixinas (Colistina)

Penicilinas+inhibidores de B-lactamasas antipseudomonas (Ticarcilina-ácido clavulánico/ Piperacilina-Tazobactam)

Cefalosporinas de 3ra y 4ta generacion (Cefotaxime/ Ceftriaxona/ Ceftazidima/ Cefepime)

Inhibidores de Folatos (Trimetoprima-sulfametoxazol)

Penicilinas+inhibidores de B-lactamasas (Ampicilina-sulbactam)

Polimixinas (Colistin/ Polimixina B)

Tetraciclinas (Tetraciclina/ Doxiciclina/Minociclina)

MDR: No susceptible a ≥ 1 agente en ≥3 categorías

XDR: No susceptible a ≥ 1 agente en todas las categorías, pero ≤2 categorías

Tetraciclinas: (Tetraciclina/ Doxiciclina/Minociclina)	PDR: No susceptible a todos los antimicrobianos listados

Fuente: Adaptado de Magiorakos et al., 2012.

Este fenómeno de la resistencia inicialmente fue observado solo en pacientes de las Unidades de Cuidado Intensivo (UCI), generando: 1) Hospitalizaciones prolongadas; 2) Mayores tasas de morbi-mortalidad; 3) No disponibilidad de antibióticos para el tratamiento de estas infecciones; 4) Aumento en los costos asociados al cuidado de la atención en salud (Schwaber et al., 2006). Sin embargo, en la actualidad se observa en otras áreas de hospitalización y aún en infecciones de origen en la comunidad (Otto, 2013).

Mecanismos de resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antibioticos puede ser generada por diferentes mecanismos. A continuación, se mencionan los principales:

Disminución en la permeabilidad de la membrana externa: La membrana externa de las bacterias Gram negativas es el primer obstáculo que deben vencer los antibióticos para alcanzar el sitio blanco, la cual a su vez funciona como una barrera de permeabilidad. Algunos antibióticos como los beta-lactámicos, tetraciclinas y algunas quinolonas, utilizan las proteínas de membrana externa también conocidas como OMP (por sus siglas en inglés *Outer Membrane Protein*), o porinas, como canales de entrada a la bacteria. Los factores que intervienen en este proceso están relacionados con la carga eléctrica del compuesto y su hidrofobicidad. Moléculas cargadas negativamente ingresan de manera lenta a la bacteria, mientras aquellas cargadas positivamente o con carga neutra (Zwitteriones) entran con mayor facilidad. Las bacterias tienen la capacidad de generar mutaciones

en las porinas que cambian su estructura y evitan que estas últimas sean utilizadas por los antibióticos como su canal de entrada (Delcour, 2009; Pagès et al., 2008).

Bombas de expulsión: Otra barrera que los antibióticos deben evadir para llegar al sitio blanco son las bombas de expulsión. Estos son sistemas generalmente de tres componentes que les permiten a las bacterias un interacambio dinamico, permitiendo el ingreso de sustancias necesarias para su desarrollo y eliminando sustancias tóxicas para su supervivencia del espacio periplásmico al espacio extracelular. Se conocen seis familias de transportadores o bombas de expulsión (Kusakizako et al., 2019), las cuales tienen la capacidad de expulsar drogas no relacionadas. Análisis cinéticos del transporte de antibióticos mostraron que estos transportadores poseen múltiples sitios de unión a sustratos, lo que les permite esa versatilidad (Shriram et al., 2018).

Alteraciones del sitio blanco: En las bacterias pueden ocurrir mutaciones capaces de alterar el sitio donde se fija y actúa el antibiótico, impidiendo que interrumpa una función vital de ésta. Un ejemplo de este mecanismo es la resistencia a quinolonas en las bacterias Gram negativas, dada por una alteración de la ADN-girasa y topoisomerasa IV por mutaciones puntuales en los genes *gyr*A y/o *par*C (Rice, 2012).

Modificación enzimática del antibiótico: Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Como ejemplo de este fenómeno están las enzimas denominadas modificadoras de aminoglucósidos que catalizan la modificación del antibiótico a través de N-acetilación, O-nucleotidilación o la O-fosforilación. El segundo grupo de enzimas son las beta-lactamasas, capaces de hidrolizar los antibióticos beta-lactámicos, principal armamento para combatir las infecciones por

bacterias multidrogorresistentes (MDR). Dentro de este grupo las beta-lactamasas tipo carbapenemasas (CARB) son las de mayor impacto clínico, ya que confieren resistencia a prácticamente la mayor parte de los beta-lactámicos (Rice, 2012).

En general, aunque todos o parte de estos mecanismos de resistencia pueden estar presentes en las bacterias Gram negativas, sin duda alguna la producción de beta-lactamasas son el mecanismo más prevalente e importante en bacterias Gram negativas. Las beta-lactamasas son enzimas producidas tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, sin embargo, en las Gram positivas, las beta-lactamasas no son el principal mecanismo de resistencia ya que son diluidas en el espacio extracelular mientras que las Gram negativas, son secretadas al espacio periplásmico donde se acumulan generando una ventaja adaptativa, ya que no es indispensable que tengan alta afinidad por el sustrato gracias a las concentraciones alcanzadas en el espacio periplásmico (Matagne et al., 1998).

Clasificación de las beta-lactamasas

Existen dos clasificaciones ampliamente utilizadas para las beta-lactamasas; la primera denominada clasificación funcional, que está basada en el espectro hidrolítico de la enzima y la susceptibilidad a inhibidores, independientemente de su ubicación cromosómica o plasmídica (Bush, 1989). Esta clasificación presenta inconvenientes relacionados con la presencia de mutaciones puntuales que puedan cambiar la actividad hidrolítica de la enzima generando la necesidad de reasignarla nuevamente a otro grupo. La segunda y la más utilizada denominada clasificación molecular, propuesta por Ambler (Ambler et al., 1991), está basada en la comparación por homología de la secuencia de los aminoácidos, lo que la hace más estable ya que, los porcentajes de

homología no se alteran fácilmente a pesar de presentar mutaciones puntuales. Esta clasificación reconoce cuatro clases designadas de la A a la D. Las clases A, C y D son evolutivamente distintas, sin embargo, comparten una relación fundamental en un residuo de serina en su sitio activo que les permite hidrolizar el antibiótico formando un enlace serín-éster, de allí su nombre de serín- beta-lactamasas. En la clase B o metalo-beta-lactamasas (MBL), su sitio activo requiere de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactores para su actividad enzimática (Tabla 2). Los genes productores de beta-lactamasas (genes *bla*) pueden estar codificados a nivel cromosomal o en elementos genéticos moviles. Se ha reportado que uno de los principales factores que propician la selección de las bacterias portadoras de estas enzimas, es el uso indiscriminado de antibióticos (Matagne et al., 1998).

Tabla 2. Clasificación molecular de las beta-lactamasas

Ambler	Bush-Jacoby-Medeiros	Substrato Preferido	Inhibición por ácido clavulánico	Enzima Representativa
A (Serin Penicilinasas)	2a	Penicilinasas	+	PC1 de *S. aureus*
	2b	Penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro, cefalosporinas de espectro extendido	+	SHV-2 a SHV-6, TEM3 a TEM-26, CTX-M
	2br	Penicilinas	-	TEM-30. SHV-72
	2c	Penicilinas, carbenicilina	+	PSE-1
	2e	Cefalosporinas de espectro extendido	+	FEC-1, CepA
	2f	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos	+/-	KPC-2, SME-1, NMCA
B (metalo-B-lactamasas)	3	La mayoria de B-lactámicos incluyendo carbapenems	-	IMP-1.VIM-1-CcrA y BeII (B1); CphA (B2); L1(B3)
C (cefalosporinasas)	1	Cefalosporinas	-	Amp-C. Cmy-2, ACT-1
D (Oxacilinasas)	2d	Penicilinas, cloxacilina	+/-	OXA-1, OXA-10

Fuente: Tomado de Drawz, SM. (Drawz y Bonomo, 2010).

Clase A

La primera beta-lactamasa codificada por plásmidos en Gram negativos fue descrita a principios de los años 60's en Grecia, en una cepa de *Escherichia coli* aislada de un hemocultivo en una paciente llamada Temoneira, razón por la cual a la enzima se le denomino TEM-1 (Livermore et al., 1986). Este gen estaba en un plásmido insertado en un transposón, lo que facilitó su rápida diseminación a otras especies y su expansión global (Bradford PA, 2001). Posteriormente apareció SHV-1 (sulfhydryl variable), otra beta-lactamasa que inicialmente fue encontrada en *E. coli* y *K. pneumoniae*. SHV-1 se encuentra en el cromosoma de la mayoría de las *K. pneumoniae* y mediada por plásmidos en *E. coli* (Bradford PA, 2001). Estas enzimas junto a TEM-2 confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación (cefalosporinas de espectro reducido).

Beta-lactamasas de espectro extendido

Para principio de la década de los 80's aparecieron las cefalosporinas de espectro extendido, las oximinocefalosporinas o cefalosporinas de tercera generación. Estas cefalosporinas no eran hidrolizadas por TEM-1, TEM-2 o SHV-1 y empezaron a ser ampliamente utilizadas para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a las cefalosporinas de espectro reducido. Como era de esperarse, la resistencia a estas cefalosporinas de tercera generación como cefotaxime, ceftriaxona y ceftazidime no tardó mucho en aparecer (Bradford PA, 2001).

La primera de estas enzimas capaces de hidrolizar los nuevos antibióticos beta-lactámicos fue SHV-2, la cual fue aislada de una *K. ozaenae* en Alemania en 1983 *(Haeggman et al., 1997)*. SHV-2 difería de SHV-1 en un aminoácido, pero esa única mutación fue suficiente para

expandir su espectro de hidrólisis. Posteriormente aparecieron enzimas derivadas de TEM-1 y TEM-2 que igualmente eran capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (Brun-Buisson y Van Saene, 1991). Debido al aumento en su espectro de hidrólisis estas enzimas fueron denominadas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y aztreonam, pero no son activas contra cefamicinas (cefoxitin y cefotetan) o carbapenémicos. Estas enzimas son inhibidas por los inhibidores de beta-lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Nishiya y Kunii, 1991).

Con la excepción de las enzimas tipo OXAs, las BLEEs están dentro de la clase A de acuerdo con la clasificación de Ambler (Bush, 2013). Dentro de las que no son derivadas de TEM o SHV se encuentran las enzimas tipo: CTX-M, PER, VEB, BES y GES, entre otras (Bush et al., 1995).

Las BLEEs tipo TEM son las beta-lactamasas más reportadas en *E. coli* y *K. pneumoniae*, pero también se han reportado en prácticamente todos las enterobacterias, además de bacilos Gram negativos no fermentadores (Coque et al., 2008). En 1987 se reportó en Francia, en una *K. pneumoniae* una enzima mediada por plásmidos que hidrolizaba cefalosporinas de tercera generación. Debido a que esta enzima tenía una alta afinidad por cefotaxime se denominó CTX-M-1, actualmente se conoce como TEM-3 y difiere de TEM-2 por dos cambios de aminoácidos (Sougakoff et al., 1989).

El nombre SHV hace referencia a "*sulfhydryl variable*" , se le denominó así debido a que se pensaba que la inhibición de la actividad de la enzima por p-cloromercuribenzoato dependía del sustrato y variaba de acuerdo al mismo (Heritage et al., 1999). La enzima SHV-1 es una beta-lactamasa de espectro reducido que tiene actividad contra las penicilinas; al igual que en el caso de TEM-1 y TEM-2, el fenotipo de BLEE apareció debido

a la presencia de mutaciones puntuales que le permitió extender su espectro de hidrólisis a cefalosporinas de tercera generación (Bradford PA, 2001). La primera BLEE derivada de SHV-1 fue descrita en 1985 y fue denominada SHV-2 debido a su homología con los genes que codifican para SHV-1. Esta enzima presentaba una sustitución de serina por glicina en la posición 238 (Paterson y Bonomo, 2005). Actualmente existe una gran cantidad de variantes de SHV que se han diseminado globalmente y han sido causantes de brotes (Paterson et al., 2003).

Las enzimas tipo CTX-M se caracterizan por tener valores de punto isoeléctrico (pI) alcalinos lo que les confiere altos niveles de resistencia a cefotaxime más que a ceftazidime, de allí proviene su nombre. Además, exhiben más susceptibilidad a tazobactam que a los demás (Cantón et al., 2012). Fueron reportadas por primera vez en 1989, alcanzando gran relevancia en los primeros años de siglo XXI debido a su diseminación global, especialmente en *E. coli* tanto a nivel hospitalario como de la comunidad (Mathers et al., 2015). La diseminación global de *E. coli* pertenecientes al clon epidémico ST131 asociados a CTX-M 15, genes de resistencia a quinolonas y otros grupos de antibióticos ha representado un problema para el tratamiento de infecciones urinarias de origen en la comunidad (Stoesser et al., 2016).

CTX-M a diferencia de TEM y SHV no apareció como variante de otras enzimas existentes, estas derivan de un gen *bla* de especies de *Kluyvera*, los cuales fueron incorporados en elementos genéticos móviles que les permitió diseminarse a otras especies (Decousser et al., 2001). Inicialmente estas enzimas tenían un mayor efecto hidrolítico sobre cefotaxime que sobre ceftazidime, sin embargo, mutaciones puntuales en su secuencia llevaron a la aparición de variantes que tenían mayor poder hidrolítico contra ceftazidime (Baraniak et al., 2002). Las beta-lactamasas del grupo CTX-M son un grupo muy heterogéneo las cuales incluyen por lo menos

seis sublinajes: CTX-M grupo 1, CTX-M grupo 2, CTX-M grupo 8, CTX-M grupo 9, CTX-M grupo 25 y KLUC, los miembros de cada grupo comparten más del 94% de identidad, mientras la identidad entre las enzimas que pertenecen a diferentes grupos es menor al 90% (Cantón et al., 2012).

Después de su aparición, CTX-M fue desplazando a las otras BLEEs debido a su circulación en plataformas genéticas móviles como plásmidos y transposones, pero también a su asociación a los denominados clones exitosos o de alto riesgo, llegando a ser las más prevalentes en todo el mundo (Woodford et al., 2011). Otra razón para su exitosa diseminación es la co-resistencia especialmente a quinolonas y aminoglucósidos. Aunque los genes que codifican para CTX-M se han reportado asociados a plásmidos conjugativos principalmente, también se han reportado insertados dentro del cromosoma (Mahrouki et al., 2012).

Para el año 1986 se reportó una BLEE que no era derivada de TEM o SHV en un aislamiento de *E. coli* obtenida de la microbiota comensal de un perro en el que se realizaban estudios farmacocinéticos de beta-lactámicos a la que denominaron FEC-1 (Matsumoto et al., 1988). En 1989 se reportó en Alemania una *E. coli* resistente a cefotaxime con las mismas características de FEC-1 y la llamaron CTX-M 1 debido a su actividad hidrolítica contra cefotaxime (Bauernfeind et al., 1996). Por esa misma época se reportaron aislamientos de *Salmonella* spp., con el mismo perfil en Sudamérica. En 1992, el mismo tipo de BLEE fue reportada en un aislamiento clínico de *E. coli*, que había sido aislado a comienzos de 1989 en Francia. A esta beta-lactamasa se le designó el nombre de MEN-1 y posteriormente se encontró que presentaba solo un 40% de identidad con TEM y SHV (Bernard et al., 1992). Algunos años después se reportó una enzima relacionada con MEN-1 con un 83% de homología, a la que se le denomino Toho-1 (Ibuka et al., 1999). La secuenciación de los genes de dos BLEEs no derivadas de TEM o SHV en 1996 reveló que CTX-M 1 era

idéntica a MEN-1 y que Toho-1 era una variante de una enzima reportada en Argentina designada como CTX-M 2 (Bauernfeind et al., 1996). Desde entonces, las enzimas tipo CTX-M han conformado una familia en continuo crecimiento que se ha diseminado prácticamente por todo el mundo (Falagas y Karageorgopoulos, 2009).

Se ha sugerido que el residuo de serina en la posición 237, presente en todas las enzimas tipo CTX-M juega un papel importante en el perfil de resistencia. Aunque se ha visto que no es esencial. El residuo de arginina en la posición 276 parece ser equivalente a la arginina en la posición 244 en los derivados de TEM o SHV y podría estar implicado en la hidrólisis de las cefalosporinas de tercera generación (Bradford PA, 2001). Los carbapenémicos son estables a la hidrólisis por CTX-M, sin embargo, la híper-expresión de algunas variantes como CTX-M 15 en combinación con disminución en la permeabilidad de membrana puede llevar a una susceptibilidad reducida a los carbapenémicos en *K. pneumoniae* y otras enterobacterias (Adler et al., 2013).

Carbapenemasas de la clase A

Las carbapenemasas son la familia más variable de beta-lactamasas y tienen la mayor capacidad hidrolítica dentro de estas enzimas; se encuentran distribuidas entre las clases moleculares A, B y D (Drawz y Bonomo, 2010). Hasta principios de los 90, las carbapenemasas descritas eran cromosomales y específicas por especie, pero dada su emergencia a través de elementos genéticos móviles se han convertido en un problema de diseminación global entre diferentes especies. En los últimos años las enterobacterias han emergido como importantes productores de carbapenemasas en todos los continentes donde han causado numerosos brotes hospitalarios e infecciones asociadas a altas tasas de mortalidad.

Por todo lo anterior, estas bacterias suponen una gran amenaza de salud pública ya que suelen ser resistentes a múltiples antibióticos beta-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, y a otros grupos de antibióticos como las quinolonas y aminoglucósidos.

Desde su primer reporte estas carbapenemasas han sido identificadas principalmente en enterobacterias tanto en aislamientos ocasionales como en brotes. Su mecanismo hidrolítico requiere la presencia de un residuo de serina en la posición 70 (Ambler et al., 1991). Tienden a hidrolizar un amplio número de beta-lactámicos incluyendo aztreonam, y son inhibidas parcialmente por ácido clavulánico y por tazobactam. Pueden ubicarse a nivel cromosomal o estar presentes en elementos genéticos móviles, lo cual permite transferencia y diseminación entre bacterias Gram negativas.

Clase B

Las enzimas de este grupo (metalo-beta-lactamasas) difieren de las de los otros grupos porque requieren moléculas de zinc en su sitio activo. Se caracteriza porque todas las enzimas son capaces de hidrolizar los carbapanémicos, pero a diferencia de las enzimas tipo serina hidrolizan pobremente al aztreonam, y no son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam (Karen Bush y Jacoby, 2010). Debido a su dependencia de un metal como cofactor (zinc) pueden ser inhibidas por quelantes de metales como el EDTA. Las metalo-beta-lactamasas (MBL) se pueden encontrar en el cromosoma bateriano, en plásmidos o integrones, sin embargo, en algunas bacterias como *Stenotrophomonas maltophilia* la MBL es intrínseca (Mercuri et al., 2002).

Las enzimas que más se han diseminado globalmente incluyen VIM, IMP y NDM. IMP (imipenem-resistant) fue la primera carbapenemasa identificada en una *Serratia marcescens* en Japón, 1990. VIM-1(Verona integronencoded MBL) fue descrita por primera vez en Italia, en 1997 en una *P. aeruginosa*. Aunque las enzimas tipo VIM son más prevalentes en *Pseudomonas* spp., también se han descrito en *enterobacterales* (Queenan y Bush, 2007).

En Colombia NDM se describió por primera vez en 2011, en un brote producido por *K. pneumoniae* en una sala pediátrica en la ciudad de Bogotá (Escobar Pérez et al., 2013). La primera VIM reportada fue VIM-8, reportada en aislamientos de *P. aeruginosa* en el 2004 (Crespo et al., 2004). En el 2006 se reportó VIM-2 en aislamientos de *P. aeruginosa* recolectadas en el 2004 de diferentes ciudades. VIM- 2 es hasta la fecha la Betalactamasa más prevalente en nuestro país (Villegas et al., 2006).

Clase C

Las enzimas de este grupo se denominan cefalosporinasas o AmpC. Son intrínsecas en muchas especies de *enterobacterales* y otras especies. *Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Morganella morganii* and *Pseudomonas aeruginosa*, portan AmpC de manera intrinseca e inducible, es decir la enzima se expresa con un bajo nivel en condiciones normales, pero puede hiper-expresarse cuando la bacteria se expone a betalactámicos, siendo algunos más inductores que otros (Jacoby, 2009). En el caso de *E. coli* y *Acinetobacter baumannii* poseen AmpC intrínseca pero no son inducibles. Bacterias Gram negativas que no poseen naturalmente AmpC pueden adquirirlas a través de plasmidos. Estas enzimas no son hidrolizadas por los inhibidores de beta-lactamasas ni por las cefamicinas (cefoxitin y cefotetan), normalmente producen resistencia a penicilinas,

cefalosporinas hasta tercera generación, sin afectar a las de cuarta generación (cefepime) ni los carbapenémicos en condiciones normales (Jacoby, 2009).

Clase D (OXAs)

Se han constituido en un importante mecanismo de resistencia, especialmente en *A. baumannii* y *enterobacterales*. Las beta-lactamasas tipo OXA son denominadas así debido a su habilidad para hidrolizar oxacilina (Bush et al., 1995). Tienen un espectro de acción muy variable, algunas solo confieren resistencia a penicilinas como oxacilina y cloxacilina; otras variantes lo hacen adicionalmente a cefalosporinas de primera generación, y otras hidrolizan carbapenémicos. En general las OXAs son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos de beta-lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Estas variantes al no hidrolizar cefalosporinas de tercera generación no son clasificadas como BLEEs, con excepción de algunas pocas variantes que hidrolizan débilmente estas cefalosporinas (Antunes y Fisher, 2014). Muchas de las beta-lactamasas tipo OXA con espectro de hidrólisis extendido son derivadas de OXA-10 (OXA-11, 14, 16, 17) y tienen la capacidad de hidrolizar débilmente cefotaxime, ceftriaxona, ceftazidime y aztreonam (Antunes y Fisher, 2014). Se ha encontrado que en general, las variantes de OXA-10 con fenotipo BLEEs presentan una de dos sustituciones de aminoácidos: una arginina por serina en la posición 143, o aspartato por glicina en la posición 157. En particular esta última sustitución parece conferir un alto nivel de resistencia a ceftazidime (Paterson DL y Bonomo RA, 2005).

El primer reporte de una carbapenemasa tipo OXA (Carbapenem-Hydrolyzing class D beta-Lactamase, CHDL) se describió en el año 1993, en una cepa clínica escocesa de *A. baumannii* aislada por primera vez en el año 1985; estas enzimas confieren una baja resistencia a los carbapenémicos (Antunes y Fisher, 2014). Las OXA-23-like están asociadas a plásmidos, pero también se han encontrado en el cromosoma. Se ha descrito con mucha frecuencia la presencia de un elemento genético móvil denominado ISAba1 asociado a *A. baumannii* el cual incrementa el nivel de resistencia a los carbapenémicos. A la fecha se han descrito gran cantidad de variantes de OXAs con actividad hidrolítica hacia los carbapenémicos, como OXA-24/40, OXA-51-like y OXA-58-like. OXA-48 fue identificada en Turquía, en una *K. pneumoniae* MDR. Esta estaba localizada en un plásmido transferible, y es a la fecha la CHDL más frecuente en *Enterobacterales*. La presencia de $bla_{\text{OXA-48-like}}$ confiere resistencia a penicilinas y decrecida susceptibilidad a los carbapenémicos, pero no hidroliza cefalosporinas de tercera generación (Poirel et al., 2004).

Otro punto importante de las OXAs es que adicionalmente a su asociación con resistencia también se utilizan para la identificación de *Acinetobacter baumannii*. Esto se logra empleando una técnica rápida y sencilla, como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite detectar de forma específica el gen cromosomal $bla_{\text{OXA-51-like}}$, que codifica para una oxacilinasa, capaz de hidrolizar penicilinas y carbapenémicos, que le confiere un bajo nivel de resistencia intrínseca a estos antibióticos (Ahmadi y Salimizand, 2017).

Los reportes alrededor del mundo de la propagación de estos mecanismos de resistencia se atribuyen a elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) que generalmente llevan consigo múltiples genes de resistencia o factores de virulencia, que han sido diseminados por linajes de bacterias denominados clones de alto riesgo (*high risk clo-*

nes) (Mathers et al., 2015). El seguimiento de estos clones de alto riesgo a nivel mundial se realizó inicialmente a través de técnicas como, la electroforesis de campos pulsados (PFGE por su acrónimo en inglés: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), pero los resultados no eran comparables a nivel global. Posteriormente aparece MLST (acrónimo en inglés: *Multilocus Sequence Typing*), demostrando ser una herramienta que permite inferir diferencias filogenéticas en poblaciones específicas en el tiempo, con base a la caracterización de Secuencias Tipo (Sequence Typing: ST). Los avances obtenidos con la implementación del MLST en el estudio de la epidemiología de enfermedades infecciosas, han posicionado esta técnica de tipificación molecular como una herramienta fundamental. Durante los últimos años la secuenciación del genoma completo ha integrando los análisis antes mencionados en una sola prueba; sin embargo, no es una herramienta que esté aun al alcance de los laboratorios para su seguimiento epidemiológico (Woodford et al., 2011).

En Colombia, la vigilancia epidemiológica de las bacterias Gram negativas portadoras de estas enzimas se ha realizado empleando Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE), lográndose establecer la clonalidad entre aislamientos a nivel nacional (Villegas et al., 2007). Sin embargo, esta técnica no permite identificar el comportamiento de estos clones en el tiempo, o si los clones nacionales guardan relación con aquellos reportados a nivel mundial; por tanto, la implementación del MLST, ha permitido a Colombia ingresar en el mapa de la epidemiología mundial de estos agentes infecciosos.

Bibliografía

Adler, M.; Anjum, M.; Andersson, D. I. y Sandegren, L. (2013). Influence of acquired β-lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in Escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 51-59. https://doi.org/10.1093/jac/dks368

Ahmadi, A. y Salimizand, H. (2017). Delayed identification of Acinetobacter baumannii during an outbreak owing to disrupted blaOXA-51-like by ISAba19. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(1), 119-122. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.006

Ambler, R. P.; Coulson, A. F.; Frère, J. M.; Ghuysen, J. M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R. C.; Tiraby, G. & Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical Journal*, 276 (Pt 1), 269-270. https://doi.org/10.1042/bj2760269

Antunes, N. T. y Fisher, J. F. (2014). Acquired Class D β-Lactamases. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 3(3), 398-434. https://doi.org/10.3390/antibiotics3030398

Baraniak, A.; Fiett, J.; Hryniewicz, W.; Nordmann, P. & Gniadkowski, M. (2002). Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(3), 393-396. https://doi.org/10.1093/jac/dkf151

Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Ernst, S. & Casellas, J. M. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 509-513.

Bernard, H.; Tancrede, C.; Livrelli, V.; Morand, A.; Barthelemy, M. & Labia, R. (1992). A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(5), 590-592. https://doi.org/10.1093/jac/29.5.590

Brun-Buisson, C. y van Saene, H. K. (1991). SDD and the novel extended-broad-spectrum beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(1), 145-147. https://doi.org/10.1093/jac/28.1.145

Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 33(3), 259-263. https://doi.org/10.1128/aac.33.3.259

Cantón, R.; González-Alba, J. M. y Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3, 110. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110

CDC. (2020, febrero 14). *Antibiotic Resistance Threatens Everyone*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html

Crespo, M. P.; Woodford, N.; Sinclair, A.; Kaufmann, M. E.; Turton, J.; Glover, J.; Velez, J. D.; Castañeda, C. R.; Recalde, M. & Livermore, D. M. (2004). Outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5094-5101. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004

Decousser, J. W.; Poirel, L. y Nordmann, P. (2001). Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from Kluyvera cryocrescens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3595-3598. https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3595-3598.2001

Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1794(5), 808-816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005

Drawz, S. M. y Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201. https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09

Escobar Pérez, J. A.; Olarte Escobar, N. M.; Castro-Cardozo, B.; Valderrama Márquez, I. A.; Garzón Aguilar, M. I.; Martinez de la Barrera, L.; Barrero Barreto, E. R.; Marquez-Ortiz, R. A.; Moncada Guayazán, M. V. & Vanegas Gómez, N. (2013). Outbreak of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1957-1960. https://doi.org/10.1128/AAC.01447-12

Falagas, M. E. y Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. The Journal of Hospital Infection, 73(4), 345-354. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021

Haeggman, S.; Löfdahl, S. y Burman, L. G. (1997). An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for Klebsiella pneumoniae, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), 2705-2709.

Ibuka, A.; Taguchi, A.; Ishiguro, M.; Fushinobu, S.; Ishii, Y.; Kamitori, S.; Okuyama, K.; Yamaguchi, K.; Konno, M. & Matsuzawa, H. (1999). Crystal structure of the E166A mutant of extended-spectrum beta-lactamase Toho-1 at 1.8 A resolution. *Journal of Molecular Biology,* 285(5), 2079-2087. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2432

Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182, Table of Contents. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08

Kusakizako, T.; Miyauchi, H.; Ishitani, R. & Nureki, O. (2019). Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes, 183154. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183154

Livermore, D. M.; Moosdeen, F.; Lindridge, M. A.; Kho, P. & Williams, J. D. (1986). Behaviour of TEM-1 beta-lactamase as a resistance mechanism to ampicillin, mezlocillin and azlocillin in Escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 17(2), 139-146. https://doi.org/10.1093/jac/17.2.139

Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G.; Harbarth, S.; Hindler, J. F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D. L.; Rice, L. B.; Stelling, J.; Struelens, M. J.; Vatopoulos, A.; Weber, J. T. & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268-281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Mahrouki, S.; Belhadj, O.; Chihi, H.; Mohamed, B. M.; Celenza, G.; Amicosante, G. & Perilli, M. (2012). Chromosomal $FF_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ associated with ISEcp1 in Proteus mirabilis and Morganella morganii isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 9), 1286-1289. https://doi.org/10.1099/jmm.0.039487-0

Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J. y Frère, J. M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: Efficiency and diversity. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 2), 581-598. https://doi.org/10.1042/bj3300581

Mathers, A. J.; Peirano, G. y Pitout, J. D. D. (2015). Escherichia coli ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 109-154. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.002

Matsumoto, Y.; Ikeda, F.; Kamimura, T.; Yokota, Y. & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(8), 1243-1246. https://doi.org/10.1128/AAC.32.8.1243

Nishiya, H. y Kunii, O. (1991). [Beta-lactamase inhibitors]. Nihon Rinsho. *Japanese Journal of Clinical Medicine*, 49(9), 2046-2051.

Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: What makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 324-330. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.007

Pagès, J.-M.; James, C. E. y Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893-903. https://doi.org/10.1038/nrmicro1994

Paterson, D. L. y Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005

Paterson, D. L.; Hujer, K. M.; Hujer, A. M.; Yeiser, B.; Bonomo, M. D.; Rice, L. B.; Bonomo, R. A. & International Klebsiella Study Group. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Anti-*

microbial Agents and Chemotherapy, 47(11), 3554-3560. https://doi.org/10.1128/aac.47.11.3554-3560.2003

Queenan, A. M. y Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458, table of contents. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07

Rice, L. B. (2012). Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(2), 198-208. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003

Schwaber, M. J.; Navon-Venezia, S.; Kaye, K. S., Ben-Ami, R.; Schwartz, D. & Carmeli, Y. (2006). Clinical and Economic Impact of Bacteremia with Extended- Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1257-1262. https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1257-1262.2006

Septimus, E. J. (2018). Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. *The Medical Clinics of North America*, 102(5), 819-829. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.04.005

Shriram, V.; Khare, T.; Bhagwat, R.; Shukla, R. & Kumar, V. (2018). Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990

Sougakoff, W.; Petit, A.; Goussard, S.; Sirot, D.; Bure, A. & Courvalin, P. (1989). Characterization of the plasmid genes blaT-4 and blaT-5 which encode the broad-spectrum beta-lactamases TEM-4 and TEM-5 in enterobacteriaceae. *Gene*, 78(2), 339-348. https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90236-9

Stoesser, N.; Sheppard, A. E.; Pankhurst, L.; De Maio, N.; Moore, C. E.; Sebra, R.; Turner, P.; Anson, L. W.; Kasarskis, A.; Batty, E. M.; Kos, V.; Wilson, D. J.; Phetsouvanh, R.; Wyllie, D.; Sokurenko, E.; Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., … Modernizing Medical Microbiology Informatics Group (MMMIG). (2016). Evolutionary History of the Global Emergence of the Escherichia coli Epidemic Clone ST131. MBio, 7(2), e02162. https://doi.org/10.1128/mBio.02162-15

Villegas, M. V.; Kattan, J. N.; Correa, A.; Lolans, K.; Guzman, A. M.; Woodford, N.; Livermore, D.; Quinn, J. P. & Group, and the C. N. B. R. S. (2007). Dissemination of Acinetobacter baumannii Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 51(6), 2001-2004. https://doi.org/10.1128/AAC.00226-07

Woodford, N.; Turton, J. F. y Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x

CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Acinetobacter baumannii* PROVENIENTES DE PACIENTES CON INFECCIONES NOSOCOMIALES Y DISPOSITIVOS TIPO CATÉTER EN VENEZUELA

Ruth Rojas*

https://orcid.org/0000-0002-2619-4021

Aura Falco**

https://orcid.org/0000-0002-8653-4868

Carlos Aranaga****

https://orcid.org/0000-0003-1806-657X

Guillermina Alonso******

https://orcid.org/0000-0002-1664-7728

* Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Miranda, Venezuela
✉ ruth-ars@hotmail.com

** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ aura.falco00@usc.edu.co

*** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ carlos.aranaga00@usc.edu.co

** ** Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
✉ guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

Para citar este capítulo:

Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C. y Alonso, G. Identificación y genotipificación de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales y dispositivos tipo catéter en Venezuela. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2021). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas.* (pp. 35-62). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

Resumen. *Acinetobacter baumannii* es uno de los principales patógenos oportunistas, resistente a múltiples antibióticos, causante de infecciones nosocomiales a nivel mundial. Puede provocar septicemias y neumonías asociadas al uso de dispositivos invasivos como catéteres y ventiladores. La diseminación de esta bacteria, que además es intrínsecamente resistente a varios grupos de antimicrobianos, plantea importantes desafíos en el tratamiento de infecciones asociadas a la atención en salud. *A. baumannii* posee el gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$, que codifica para una oxacilinasa, capaz de hidrolizar penicilinas y carbapenémicos, que le confiere un bajo nivel de resistencia intrínseca a estos antibióticos. En Venezuela son pocos los reportes relacionados con infecciones nosocomiales causadas por estas bacterias, siendo este el motivo por el cual se planteó identificar y genotipificar aislados de *A. baumannii* provenientes de dispositivos invasivos tipo catéter y su comparación con otros aislados nosocomiales de la misma especie, provenientes de diversos centros de salud de Caracas. Para ello se realizaron pruebas bioquímicas y moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias específicas (rep-PCR) que permitieron establecer relaciones genéticas entre aislados; y su identificación hasta el nivel de especie empleando iniciadores específicos para amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr y el gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Los resultados indican que se identificaron los aislados evaluados y se estableció la filogenia entre ellos, lo cual pone en evidencia la importancia que tienen los estudios epidemiológicos para apoyar sistemas de vigilancia, permitiendo el establecimiento de medidas adecuadas de prevención en la diseminación de estos patógenos de importancia clínica.

Palabras claves: *Acinetobacter baumannii*, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, genotipificación, resistencia, antibióticos.

Abstract. *Acinetobacter baumannii* is now recognised as causing a broad range of severe nosocomial infections, including ventilator-associated pneumonia as well as bloodstream infections in critically ill patients. Its resistant to several antimicrobial groups, poses significant challenges in the treatment of health care associated infections. The $bla_{\text{OXA-51-like}}$ gene encodes for an oxacillinase, which confers low levels of intrinsic resistance to penicillin and carbapenems. In Venezuela there are few reports related to nosocomial infections caused by these bacteria, for that we proposed to identify and genotype *A. baumannii* isolates from the invasive catheter-type devices and their compare these with other nosocomial isolates of the same species, from some health centers in Caracas. For this, biochemical and molecular tests such as the polymerase chain reaction to amplify specific sequences (rep-PCR) were performed to establish genetic relationships between isolates; and its identification at specie level using specific primers to amplify the gene responsible for encoding the 16S subunit of the rRNA and the $bla_{\text{OXA-51-like}}$. The results indicate that the isolates were identified as *A. baumannii* and the phylogeny between them was established. This demonstrates the importance of epidemiological studies to generate surveillance systems in health centers related to nosocomial infections associated with the use of catheters. These surveillance systems would provide basic information to develop control measures to prevent the spread of these pathogens on these environments.

1. Introducción

Las bacterias son microorganismos capaces de causar infecciones nosocomiales en el 9% de los pacientes hospitalizados que se encuentran ubicados en áreas de alta densidad poblacional como: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), salas neonatales, salas de medicina, cirugía y pediatría (Padgett et al., 2013; Chincha et al., 2013). Este tipo de infecciones

son consideradas como un problema clínico y de salud pública a nivel mundial debido a los altos costos de hospitalización y a la mortalidad, especialmente cuando está asociada a bacterias que son capaces de colonizar dispositivos médicos como catéteres y ventiladores, formando una matriz biológica que puede interferir con la administración de los tratamientos (Ojeda y Megías, 2000; Buffet et al., 2012).

Una de las especies que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas humanas es *Acinetobacter baumannii*, que forma parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* con: *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* y la especie ambiental *Acinetobacter calcoaceticus* (Falah et al., 2019; Rolain et al., 2016; Peleg et al., 2008; Bergogne-Berezin y Towner, 1996; Bouvet y Grimon, 1987). Estas bacterias son cocobacilos Gram negativos, aerobios, no fermentadores, catalasa positiva y oxidasa negativa e inmóviles (Hernández et al., 2010) que habitan ambientes naturales muy variados como el suelo, el agua y los alimentos; adicionalmente, se encuentran en entornos hospitalarios y en dispositivos médicos como ventiladores mecánicos, catéteres, entre otros (González et al., 2002; Berdinelli y Friedman, 2008; Falah et al., 2019). Más específicamente, *A. baumannii* es capaz de causar bacteriemias, neumonías, meningitis, infección del tracto urinario, entre otras patologías (Peleg et al., 2010; Abdi et al., 2014). En países como Estados Unidos y Canadá, se ha reportado que *A. baumannii* fue el noveno patógeno más común en infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo, mientras que en América Latina fue responsable del 5,3% de todos los aislados de bacteriemias nosocomiales, lo cual pone en evidencia la importancia epidemiológica de este patógeno en los recintos hospitalarios (Richards et al., 2000; Gales y col., 2001; Brenner et al., 2004; Lemos et al., 2011).

Adicionalmente, *A. baumannii* se caracteriza por poseer una notable resistencia a antibióticos tanto de forma natural como adquirida

(Chalbaud y Alonso, 2017) que incluye a las fluoroquinolonas y a las cefalosporinas, que son las principales opciones terapéuticas que se usan para tratar infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas (Karaiskos et al., 2019).

Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos en esta bacteria involucran la producción de beta-lactamasas intrínsecas y/o adquiridas. *A. baumannii* produce una cefalosporinasa cromosómica llamada AmpC, que es capaz de hidrolizar débilmente las cefalosporinas, así como una enzima intrínseca del tipo oxacilinasa, llamada OXA-51, que confiere bajos niveles de resistencia a penicilinas y carbapenémicos. Otros mecanismos de resistencia presentes en esta bacteria incluyen: aumento en la expresión de bombas de eflujo, alteraciones en las porinas que bloquean la entrada de antibióticos y la capacidad de adquirir múltiples genes que confieren resistencia a antibióticos (Du et al., 2019).

Por lo descrito previamente, el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *A. baumannii* resistentes a múltiples antibióticos se ha convertido en un grave desafío clínico debido a que las opciones terapéuticas disponibles son limitadas. Este panorama puede volverse más complejo si a esto se le suma el hecho de que a nivel mundial hay un incremento en el número de las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* asociadas al uso de catéteres. Estas Infecciones pueden estar asociadas con la atención en salud (IAAS), así como la migración de microorganismos cutáneos hacia el sitio de inserción, a la contaminación de las conexiones del catéter, a la contaminación de los fluidos en infusión o la contaminación secundaria por bacteriemias (Du et al., 2019).

Debido a la importancia clínica de *A. baumannii* se han desarrollado varios métodos para identificarla. Para ello, en el laboratorio de diagnóstico clínico se aplican diversas pruebas fenotípicas que incluyen: crecimiento

en agar MacConkey y en agar sangre, tinción de Gram, así como pruebas bioquímicas como: oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación de carbohidratos, motilidad, Simmons citrato, Rojo Metilo–Voges Proskauer y crecimiento a 37°C y 44°C (Falah et al., 2019). Sin embargo, estas pruebas no tienen el poder discriminatorio para diferenciar entre las especies del complejo *A. calcoaceticus–A. baumannii* (Rolain et al., 2016). Debido a esta dificultad se han desarrollado diferentes métodos moleculares entre los cuales se encuentra la detección del gen cromosomal $bla_{\text{OXA-51-like}}$ a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), la cual es una técnica sencilla y rápida (Seng et al., 2010; Rolain et al., 2016).

Por otro lado, para llevar a cabo estudios epidemiológicos no solo es importante conocer la identidad de agente infeccioso, sino también establecer filogénesis entre los aislados de la misma especie (Sevillano y Gallego, 2011; Allen y Hartman, 2016; Rolain et al., 2016). Existen diferentes pruebas genotípicas que permiten estudiar la relación de los aislados de *A. baumannii*. Los resultados que se obtengan pueden proporcionar información sobre la fuente de transmisión (Kang et al., 2003) y facilitar la evaluación de las medidas de control, mediante la determinación de la prevalencia (Vílchez y Alonso, 2009). Algunas de estas pruebas incluyen métodos basados en PCR, entre las que se incluyen: amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR por sus siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase Chain Reaction*), polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism PCR*), y la amplificación de dos tipos de secuencias cortas, repetidas y distribuidas a lo largo del genoma bacteriano, llamadas rep-PCR (por sus siglas en inglés: *Repetitive Extragenic Palindromic* PCR) y ERIC-PCR (por sus siglas en inglés: *Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus PCR*) (Kang et al., 2003; Vílchez y Alonso, 2009).

En este estudio se realizó la identificación de aislados de *A. baumannii* provenientes de dispositivos invasivos tipo catéter y causantes de infecciones nosocomiales, recolectados en distintos centros de salud ubicados en Caracas, Venezuela. Los aislados fueron identificados fenotípicamente, aplicando pruebas bioquímicas; y genotípicamente, a través de una PCR que permitió detectar el gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Finalmente se realizó la genotipificación de aislados de *A. baumannii* aplicando las técnicas rep-PCR y ERIC-PCR, con el fin de establecer posibles relaciones genéticas entre aislados de distintos centros de salud ubicados en Caracas, esto con el fin de fortalecer el sistema de vigilancia y monitoreo para la prevención de infecciones asociadas a *A. baumanii* en este tipo de dispositivos médicos.

2. Metodología

Aislados bacterianos

Se evaluaron 14 aislados bacterianos provenientes de muestras de pacientes portadores de catéteres, que presentaron un cuadro infeccioso provocado por *A. baumannii* y de pacientes que presentaron algún tipo de infección nosocomial asociada al mismo patógeno (Tabla 3).

Diez de las muestras de *A. baumannii* evaluadas provienen del Hospital Universitario de Caracas (HUC) y fueron aisladas de pacientes con infecciones asociadas al uso de catéteres. También se analizaron cuatro muestras de la misma especie, provenientes de pacientes de distintos centros de salud ubicados en Caracas, que presentaron infecciones nosocomiales durante su permanencia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Tabla 3. Información clínica de los aislados de *A. baumannii* evaluados.

Identificación aislado	Fecha de la muestra	Hospital	Servicio	Sexo del paciente	Perfil de resistencia
1166	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	CAZ, GN, AMC, FEP
1169	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	CAZ, AMK, SAM, IPM, FEP
1520	Mayo, 2012	HUC	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM
1172	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	TZP, CAZ, IPM, NOR, GN
1115	Mayo, 2012	HUC	Cardiología	Femenino	CAZ, FEP, AMK, IPM, CIP
1127	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	TGC, CIP, AMK, IPM, FEP, CAZ
1159	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	IPM, CIP, FEP, CAZ
2868	Mayo, 2012	HUC	M1	Femenino	LEV, AMK, TZP, IPM, CAZ
3547	Mayo, 2012	HUC	UTI	Femenino	CIP, NOR, IPM, CAZ
1521	Mayo, 2012	HUC	NI	NI	NI
207	Marzo, 2007	Instituto Médico La Floresta	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM, SAM
507	Mayo, 2007	Policlínica Metropolitana	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM, SAM
607	Junio, 2007	Policlínica Metropolitana	UTI	Femenino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM
1007	Febrero, 2007	Instituto Médico La Floresta	UTI	Masculino	GN, AMK, CIP, TZP, CAZ, FEP, IPM, MEM

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: UTI: Unidad de Terapia Intensiva, HUC: Hospital Universitario de Caracas, M1: Sala de Medicina 1, TZP: tazobactam-piperacilina, IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, GN: gentamicina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, FEP: cefepime; SAM: sulbactam-ampicilina, AMK: amikacina, NOR: norfloxacina, CIP: ciprofloxacina, TGC: tigeciclina, MEM: Meropenem; LEV: Levofloxacina. NI: información no disponible.

Se mantuvo en el anonimato el nombre de los pacientes para garantizar su privacidad. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia en el año 2000 (Rothman, 2000) y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela (MPPCTII, 2009).

Identificación y perfil de sensibilidad de los aislados

Las pruebas de identificación y de sensibilidad bacteriana de los aislados las realizaron cada uno de los centros hospitalarios empleando el sistema automatizado Vitek® (*Biomerieux*), siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) del año 2012 (CLSI, 2012). Una vez recibidos en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, se aplicaron pruebas que permitieron verificar la identificación, tales como: tinción de Gram, catalasa, oxidasa, Kliger, crecimiento a 42°C, crecimiento en agar MacConkey, producción de indol, sulfuro de hidrógeno y motilidad (MacFaddin, 2003), como ha sido descrito previamente (Chalbaud y Alonso, 2017; Angiolillo et al, 2017, Toba et al, 2018).

Extracción de ADN genómico

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando un lisado celular de *A. baumannii* según Levesqué et al, (1995). Para ello se colocó una colonia aislada en 2 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C con agitación durante 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µl de dicho cultivo en 800 µl de agua ultra pura y se hirvió en baño de maría durante 10 minutos. La suspensión bacteriana se centrifugó a 12.000 rpm durante dos minutos y el sobrenadante fue usado para realizar la PCR.

Identificación molecular

Para verificar la identificación de los aislados de *A. baumannii* se realizaron dos reacciones de PCR, una utilizando una secuencia de la subunidad ribosomal 16S específica de la especie y otra para amplificar el gen $bla_{\text{OXA-51}}$. En el primer caso se utilizaron los iniciadores 16SF: 5'-GACGTACTCGCAGAATAAGC-3', y 16SR: 5'-TTAGTCTTGCGACCGTACTC-3' propuestos por Lin et al. (2009), los cuales amplifican una región de la subunidad 16S de 426 pb. El volumen final de reacción fue de 25µl: 1 µl de la muestra de ADN y 24 µl de la mezcla de reacción (Buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 200 µM de dNTPs, Mg^{+2} (3 mM), 1U *Taq* polimerasa) y 1 µM de cada uno de los cebadores. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research) con las siguientes condiciones de reacción: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, extensión 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Para la amplificación del gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$, se preparó igualmente una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl que contuvo: 1 µl de ADN

total, Buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), dNTPs (200 µM), Mg^{+2} (1.5 mM), *Taq* polimerasa (1U) y cebadores (0.5 µM c/u). Los iniciadores utilizados fueron los reportados por Woodford y colaboradores (2006), OXA-51-likeF (5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3') y OXA-51-likeR (5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG3'). La reacción fue llevada en a una desnaturalización inicial a 94ºC por 3 min, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94 ºC, 45 seg a 57 ºC, y 1 min a 72 ºC, seguido por una extensión final a 72 ºC durante 5 min.

En todas las reacciones de PCR se utilizó como control negativo una mezcla de todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen (control de reactivos) y como control positivo de la reacción se usó una cepa previamente caracterizada en el Laboratorio de Biología de Plásmidos como *A. baumannii*, denominada AB3. Los productos de la PCR fueron analizados en electroforesis horizontales en geles de agarosa al 1%, tratados con bromuro de etidio y visualizados en un equipo de fotodocumentación GelDoc (Bio-Rad, USA).

Genotipificación bacteriana empleando la técnica rep-PCR

La caracterización genotípica de las muestras se realizó empleando la técnica rep-PCR y el oligonucleótido único REP1 (5'-GCGCCGICATGCGGCATT-3') (Horcajada et al, 2002). Para este ensayo, las condiciones de reacción utilizadas fueron 94ºC durante 5 minutos, 94°C por 1 min, 50ºC durante 1 minuto y 72ºC por 8 minutos durante 35 ciclos, con una extensión final de 72°C por 15 min. Se empleó como control positivo la cepa AB3 de *A. baumannii*. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis horizontales en geles de agarosa, como se describió previamente.

Análisis de los resultados de la genotipificación por rep-PCR

El criterio para determinar la relación entre los aislados fue el reportado por Tenover et al. (1995), quienes definieron cuatro categorías de relación genética y epidemiológica: a) Indistinguibles: son aislamientos que muestran patrones de bandas iguales por lo que pueden ser considerados clones; b) Estrechamente relacionados: los patrones de bandas difieren en dos o tres bandas; c) Posiblemente relacionados: sus patrones muestran cuatro a seis bandas de diferencia, y; d) No relacionados: los patrones de bandas difieren en más de seis (Falco et al, 2017; Tenover et al., 1995). El análisis *in silico* se realizó empleando el programa Phoretix 1D Gel Image Analysis Software (Totallab, Newcastle, Reino Unido). Partiendo de cada registro fotográfico se normalizan los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis, de acuerdo con el factor de retardo (Rf, por sus siglas en inglés) y se compararon las imágenes. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para la matriz de distancia y el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) para la creación de los dendrogramas.

3. Resultados

Identificación fenotípica de los aislados bacterianos de *A. baumannii*

Los aislamientos utilizados en este estudio presentaron la siguiente distribución temporal: el primer grupo de cepas provienen del Hospital Universitario de Caracas (HUC) y fue aislado durante los meses de mayo a septiembre del 2012. Las muestras del segundo grupo provienen del Instituto Médico La Floresta y la Policlínica Metropolitana, y también fueron tomadas en un período de 4 meses, de febrero a junio del año 2007 (Tabla 3). El 85% de los aislados (11/13) provenía de las unidades de terapia Intensiva de los distintos recintos hospitalarios (Tabla 3). Es

importante mencionar que existe una separación espacial considerable de cada uno de los centros de salud que formaron parte del estudio.

Todos los aislamientos utilizados en este estudio fueron identificados de forma automatizada como *A. baumannii* por los laboratorios de bacteriología de cada uno de los recintos hospitalarios que suministraron los aislados. Una vez que se recibieron las muestras en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, se procedió a hacer una confirmación de la identificación bacteriana empleando diferentes pruebas fenotípicas. Los resultados indican que todas son cocobacilos Gram negativos, lo cual coincide para la morfología celular de este organismo. Las colonias fueron sometidas a distintas pruebas bioquímicas que permitieron una aproximación hacia la especie de estudio. Los resultados indican que el 100% de los aislamientos eran no fermentadores, inmóviles, no productores de indol ni H_2S y oxidasa negativos. Finalmente, las cepas presentaron crecimiento a 44ºC, temperatura característica de la especie. Todos estos resultados en conjunto permiten sugerir que los aislados bacterianos evaluados pueden ser clasificados como *A. baumannii*.

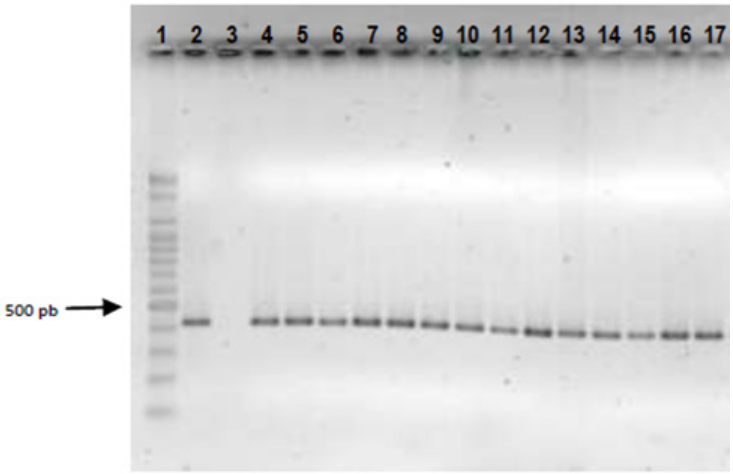
Perfil de sensibilidad de los aislados de *A. baumannii*

Con el fin de determinar el perfil de sensibilidad de los aislados de *A. baumannii* que forman parte de este estudio, se evaluaron de forma automatizada trece (13) antibióticos pertenecientes a cuatro (4) familias diferentes: beta-lactámicos (ceftazidima, cefepima, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y los carbapenémicos: imipenem y meropenem); aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y levofloxacina) y glicilciclinas (tigeciclina).

Los resultados indican que el 100% de los aislados son resistentes a múltiples antibióticos. Por ejemplo, el 100% fue resistente a ceftazidima (cefalosporina de tercera generación), el 84,6% a imipenem (11/13), el 77% a cefepima (cefalosporina de cuarta generación), el 69,2% a ciprofloxacina y a amikacina (9/13), mientras que el 7,7% a tigeciclina (1/13) (Tabla 3).

Identificación molecular de los aislados de *A. baumannii*

Con la finalidad de complementar los resultados obtenidos a través de las pruebas bioquímicas y microbiológicas, se realizó la amplificación por PCR de una región altamente conservada del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S empleando iniciadores especie específicos. Los resultados obtenidos indican que los 14 aislados son *A. baumannii* debido a que se obtuvo un amplificado con el tamaño de banda esperado (426 pb) (Figura 1).

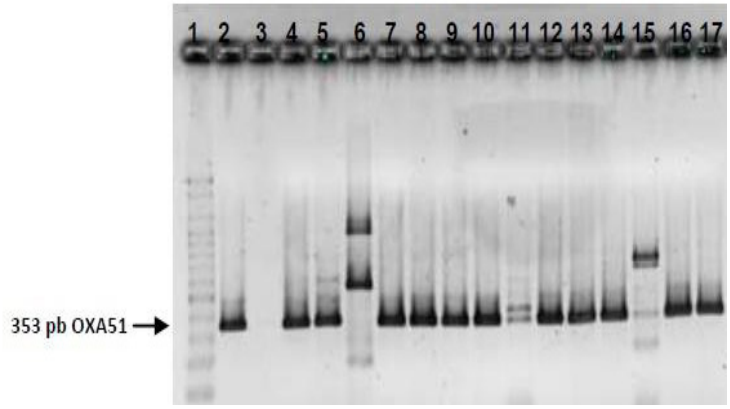


Fuente: Elaboración propia.

Figura 1: Registro fotográfico de la corrida electroforética horizontal de un gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR de una sección del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S en *A. baumannii*. Carril

1: Marcador de Peso Molecular 100 pb (*New England Biolabs*); Carril 2: AB3 (Control positivo); Carril 3: Control negativo; Carril 4: aislado 207; Carril 5: aislado 507; Carril 6: aislado 607; Carril 7: aislado 1007; Carril 8: aislado 1115; Carril 9: aislado 1127; Carril 10: aislado 1159; Carril 11: aislado 1166; Carril 12: aislado 1169; Carril 13: aislado 1172; Carril 14: aislado 1520; Carril 15: aislado 1521; Carril 16: aislado 2868; Carril 17: aislado 3547.

Adicionalmente, se realizó una PCR para verificar la identidad de los aislados evaluados a través de la detección del gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (WoodFord et al., 2006). El 93% de los aislados evaluados (13/14) generaron una banda del tamaño esperado (353 pb; Figura 2). Sin embargo, en tres de estos aislados, en el 507 (Carril 5), en el 1166 (Carril 11) y en el 1521 (Carril 15), además de observar la banda de 353 pb, también se observaron bandas inespecíficas. Finalmente, para la muestra 607 (Carril 6) no se obtuvo el amplicón de tamaño esperado.



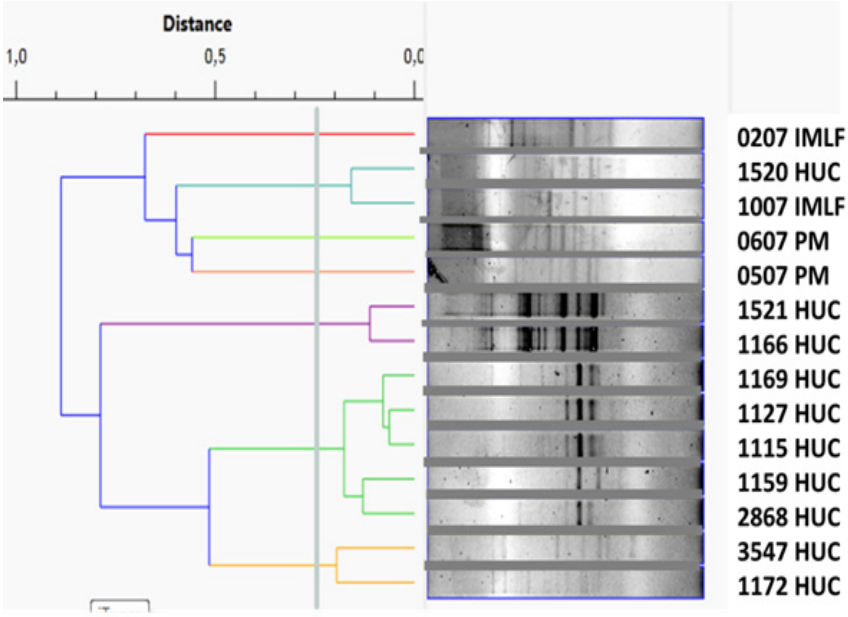
Fuente: Elaboración propia.

Figura 2. Registro fotográfico de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (New England Biolabs); Carril 2: AB3 (Control positivo); Carril 3: Control negativo; Carril 4: aislado 207; Carril 5: aislado 507; Carril 6: aislado 607; Carril 7: aislado 1007; Carril 8: aislado 1115; Carril 9: aislado 1127; Carril 10: aislado

1159; Carril 11: aislado 1166; Carril 12: aislado 1169; Carril 13: aislado 1172; Carril 14: aislado 1520; Carril 15: aislado 1521; Carril 16: aislado 2868; Carril 17: aislado 3547.

Genotipificación de los aislados de *A. baumannii*

En la Figura 3 se puede observar el dendrograma obtenido con la tipificación de los aislados empleando el método rep-PCR. En ella se pueden observar cuatro (4) grupos relacionados genéticamente y señalados con las letras A, B, C y D. El grupo A está constituido por las muestras 1169, 1127, 1115, 1159 y 2868. El B lo conforman las cepas 3547 y 1172; el grupo D las muestras 1521 y 1166, mientras que el C por los aislados 1007 y 1520. Las cepas 207, 507 y 607 son clones únicos y existen dos pares de clones indistinguibles que corresponden a las muestras 1520, 1007 y a las 1115 y 1127, respectivamente. Los resultados permiten afirmar que existe gran variabilidad genética entre los aislados evaluados.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la genotipificación de los aislados de *A. baumannii* provenientes de distintos centros de salud de la ciudad de Caracas empleando rep-PCR

4. Discusión

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública a nivel mundial debido a que ocasionan un aumento en la morbilidad y en la mortalidad de los pacientes (Padgett et al., 2013). Además, generan mayores costos durante su estancia prolongada en el centro hospitalario debido a que hay que aplicar una antibioticoterapia adecuada (Ramírez et al., 2013). Por lo tanto, su estudio permite recabar información de interés para reconocer las fuentes de infección, los factores de riesgo para el paciente, las vías de diseminación y los posibles reservorios de microorganismos causantes de la infección, lo cual conlleva al establecimiento de bases de datos epidemiológicas, medidas de prevención y control adecuadas, que pueden garantizar mejor calidad de vida al paciente hospitalizado y menores costos en salud (Padgett et al., 2013). Un aspecto importante del estudio epidemiológico de estas infecciones es comprender cómo se diseminan las cepas bacterianas dentro de un hospital o entre hospitales de un área determinada (Rivas et al., 2008).

En Venezuela, el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos - PROVENRA (http://www.provenra.org), ha permitido mantener monitoreados, de manera activa, los valores de la resistencia bacteriana a los antibióticos, y con esto, el problema asociado de las infecciones nosocomiales. Sin embargo, no existe una organización encargada de monitorear directamente las infecciones intrahospitalarias, para conocer los valores reales de incidencia a nivel nacional. En el caso del Hospital Universitario de Caracas, la Subcomisión de Infecciones (SCI-HUC) es la encargada de recopilar los datos relacionados con los reportes

de las infecciones intrahospitalarias en dicho recinto de salud. Para el año 2007,se reportó una incidencia de 14,11 casos de infecciones nosocomiales por cada 100 pacientes hospitalizados, 2 puntos porcentuales superior al valor reportado en el 2006 (Pitteloud et al., 2007). Es importante mencionar que, de acuerdo con el perfil de susceptibilidad a antibióticos, todos los aislados analizados en este trabajo demostraron ser resistentes a múltiples drogas (Tabla 1), lo cual complica el manejo terapéutico de los pacientes que adquirieron la infección nosocomial.

De acuerdo con un estudio realizado por Seisdedos et al.(2012), una de las principales causas de complicaciones nosocomiales, que ocupa el cuarto nivel entre las infecciones de mayor frecuencia, es la bacteriemia asociada a contaminación de catéteres. En este estudio se verificó la presencia de organismos del género *Acinetobacter* en muestras de pacientes con infecciones asociadas al uso de este dispositivo médico. Dadas las dificultades que existen para poder realizar la clasificación taxonómica adecuada de las especies correspondientes al género *Acinetobacter*, la cual se basa en características fenotípicas, se han desarrollado estudios genotípicos que permitan la identificación definitiva del microorganismo de interés, tal como es el caso del uso de secuencias específicas de genes ubicados en el cromosoma que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal y para la oxacilinasa OXA-51.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, ambos genes se pueden emplear para identificar a *A. baumannii*. Esto de se debe a que el 100% de los aislados dio positivo para el amplificado correspondiente a la secuencia específica de la subunidad ribosomal 16S (Fig. 1), mientras que en el 93% de los casos se obtuvo el amplificado correspondiente al gen $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (Fig. 2). La única cepa que no dio positiva para este gen fue la 607, sin embargo, según Turton et al. (2010), se han reportado patrones positivos modificados y un 100% de especificidad para la técnica ya que

microorganismos distintos de *A. baumannii*, no generan ningún tipo de amplicón con estos iniciadores específicos (Turton et al., 2010).

Con respecto a la epidemiología molecular de los aislados estudiados y de acuerdo con los patrones obtenidos con el rep-PCR, se demostró la presencia de aislados relacionados genéticamente, los cuales se agruparon como: A, B y D (Fig. 3). En el grupo A hay dos muestras, la 1127 y la 1115, que resultaron estar estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético debido a que ambas fueron aisladas de catéter, en mayo del año 2012, en el Hospital Clínico Universitario. Estas cepas comparten el mismo perfil de resistencia a antibióticos, a excepción de que la primera también es resistente a tigeciclina y la segunda a ciprofloxacina. Además, fueron aisladas de distintos servicios del hospital (UTI y cardiología, respectivamente), lo cual podría sugerir que pueden ser parte de una contaminación que está generando infecciones nosocomiales a los pacientes ingresados en el HUC. En el mismo grupo A, se observa que los aislados 2868 y 1169 del mismo hospital (Tabla 1), resultaron estar estrechamente relacionadas genéticamente porque su patrón difiere en 3 bandas (Fig. 3). Estas diferencias se pueden deber a un único evento mutacional que pudo ocurrir en el ancestro común que las originó y que, en ocasiones, puede observarse cuando se hacen varias tomas de muestras del mismo paciente (Tenover et al., 1995).

En el grupo B, las muestras 1172 y 3547 también fueron definidas como estrechamente relacionadas genéticamente, ambas provienen de la UTI, solo que la muestra 1172 fue tomada en mayo de 2012; mientras que la muestra 3547, en septiembre de 2012. Ambas muestras provienen de pacientes diferentes.

En el grupo C también hay dos muestras, la 1127 y 1115, que resultaron ser clones. Ambas cepas comparten el mismo perfil de resistencia a

antibióticos, pero la primera de ellas fue aislada en la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto Médico La Floresta en el año 2007, mientras que la segunda fue aislada en el 2012, en la misma unidad, pero ahora en el Hospital Clínico Universitario. Los resultados podrían sugerir que este clon pudo ser dispersado por personal asociado a la atención en salud, en el caso de que labore en más de un centro asistencial. Se sugiere aplicar el esquema de secuenciación de múltiples *locus* o MLST (por sus siglas en inglés, *Multi Locus Sequence Type*) para confirmar la clonalidad de ambos aislados (Diancourt et al., 2010).

Por su parte, la muestra 207 del Instituto Médico La Floresta no estaba relacionada genéticamente con ningún otro aislamiento, mientras que las muestras 507 y 607 de la Policlínica Metropolitana, resultaron ser clones (Fig. 3). Es importante mencionar que estas tres (3) cepas mostraron tener una baja relación con los aislados provenientes del HUC. Sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede asegurar que la relación entre los aislados provenientes de diferentes centros de salud se deba a clones circulantes. Para ello se requieren estudios más exhaustivos, que incluyan tanto la toma de muestras de ambientes de ambos centros de salud y del personal que pudiera laborar en ambos centros, así como la evaluación de la historia clínica de los pacientes recluidos en los servicios de ambos hospitales, con el fin de verificar si han sido hospitalizados en uno de los centros de salud incluidos en este estudio y luego trasladados a otro.

En un estudio realizado en el año 2005, por Pancholi y colaboradores, se realizó la caracterización molecular de aislados provenientes de manos y de ambientes de cuidadores. Los autores reportan que cepas de *A. baumannii* tomadas de manos resultaron indistinguibles de algunas provenientes del ambiente (Pancholi et al., 2005). Afirman que si bien, las cepas ambientales resultan susceptibles a los agentes antimicrobianos, en el ambiente hospitalario pueden convertirse en patógenos potenciales.

Este estudio da indicios que las cepas de *A. baumannii* podrían encontrar algún reservorio en la comunidad que sirva como fuente de infección nosocomial. Por lo expuesto se puede sugerir que existe la posibilidad de dispersión de aislados nosocomiales de un hospital a otro, dentro de un área geográfica determinada. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio resultan limitados para explicar la relación entre aislados provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Caracas.

Es fundamental el desarrollo de estudios epidemiológicos que empleen técnicas moleculares para la determinación de las relaciones filogenéticas entre aislados nosocomiales asociados a pacientes portadores de dispositivos tipo catéter. Los resultados obtenidos permiten determinar posibles brotes infecciosos, pero a su vez facilitan el desarrollo de medidas de prevención y control específicas y en consecuencia efectivas que tanto hacen falta en un país en el que el sistema de salud se encuentra actualmente colapsado por la carencia de medicamentos.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto CDCH PG-03.335416 y el Proyecto de Investigación e Innovación PEII No.2012000977, coordinados por Guillermina Alonso del Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos del Instituto de Biología Experimental.

Bibliografía

Abdi, A.; Hendiani, S.; Mohammadi, P.; Gharavi, S. (2014). Assesment of Biolfilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol*.7(1):1-5.

Allen, DM & Hartman, BJ. (2009). Acinetobacter species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. New York: Churchill Livingstone Elsevier; p. 2881–5.

Angiolillo, G.; Fernandez, S.; Falco, A.; Aranaga, C. & Alonso G. (2017). Characterization of plasmids from E. coli SXT resistant isolates from urinary tract infections in Venezuela. *Kasmera Journal*, 45 (11):17-31.

Berdinelli, M. y Friedman, H. (2008). *Acinetobacter biology and pathogenesis*. Springer. Nueva York. E. U. A. Disponible en: https://books.google.co.ve.

Bergogne-Berezin, E. y Towner, K. (1996). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*; 9(2): 148–165

Bouvet, P. y Grimont, P. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. In: *Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie*. Masson SAS: Elsevier.

Brenner, P.; Otaíza, F; Bustamante R. (2004). Nosocomial infections outbreaks in Chile 1985–2002. *Am J Infect Control*. 32(3): E49.

Buffet, S.; Tattevin, P.; Bonnaure, M. & Jolivet, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds a critical review. *Int J Antimicrob Ag*. 39(5): 381-389.

Chalbaud, A. y Alonso, G. (2017) Análisis y distribución de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas de origen hospitalario. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 72, http://vitae.ucv.ve.

Chincha, O; Cornelio, E; Valverde, V. & Acevedo, M. (2013). Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.30(4):616-20.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22 Edition International Supplement M100-S26, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI; 2012.

Diancourt, L.; Passet, V.; Nemec, A.; Dijkshoorn, L. & Brisse, S. (2010). The population structure of Acinetobacter baumannii: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*. 5(4): e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034.

Du, X.; Xu, X.; Yao, J.; Deng, K.; Chen, S.; Shen, Z.; Yang, L. & Feng, G. (2019). Predictors of mortality in patients infected with carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 16. pii: S0196-6553(19)30151-8. doi: 10.1016/j.ajic.2019.03.003.

Falah, F.; Shokoohizadeh, L. & Adabi, M. (2019). Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars Burn Heal*.; 5: 2059513119831369. doi: 10.1177/2059513119831369.

Falco, A; Barrios, Y; Torres, L; Sandrea, L, Takiff, H. (2017). Epidemiología molecular de aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. *Inv Clin*; 58: 3-21.

Gales, A.; Jones, R.; Forward, K.; Linares, J.; Sader, H. & Verhoef, J. (2001). Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and Stenotrophomonas maltophilia as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Clin Infect Dis*. 32(2supl). pp. 104–113.

González, M.; Izquierdo, A.; Luque, M.; Sánchez, A.; Díaz, M. & Torres, M. (2002). Infecciones urológicas por *Acinetobacter*. Estudio de casos y aplicación del protocolo de actuación de enfermería. *Asoc. Esp. Enf. Uro.* 28 (82): 28- 32.

Hernández, A.; García, E.; Yagüe, G. & Gómez, J. (2010). Acinetobacter baumanii multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter.*23(1):12-19.

Horcajada, J.; Vila, J.; Moreno, A.; Ruiz, J.; Martínez, J.; Sanchez, M.;, Soriano, E. & Mensa, J. (2002). Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinilones in *Escherichia coli* after prolongued administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. *J. Antimicrob Chemother*. 49(1): 55-59.

Kang, H. y Dunne, W. (2003). Stability of Repetitive-Sequence PCR Patterns with Respect to Culture Age and Subculture Frequency. *Journal of Clinical Microbiology;* 41 (6): 2694– 2696.

Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V. & Poulakou, G. (2019). The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health*.; 7:151. doi: 10.3389/fpubh.2019.00151.

Lemos, E.; Restrepo, F.; Alvis, N.; Quevedo, E.; Cañon, O. & León, Y. (2011). Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Rev Panam Salud Publica*.30(4): 287–294.

Lin, L.; Ling, B. & Li, X. (2009). Distribution of multidrog efflux pump genes *adeABC*, *adeDE*, and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multipleantimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int. J. Microb. Agents*. 33(1): 27- 32

Levesque, C.; Piche, L.; Larose, C. & Roy, P. (1995). PCR mapping of integrons revealsseveral novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1):185-191.

MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ra. Edición. Ciudad de México, México. Editorial Médica Panamericana.

MPPCTII. (2009). Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad. Tercera Edición. República Bolivariana de Venezuela. Caracas.

Ojeda, E. y Megías, G. (2000). Infecciones asociadas a catéteres. Disponible en: http://www.uninet.edu/cin2000/conferences/ojeda/ojeda.html. Consultado en agosto de 2019.

Pancholi, P.; Healy, M.; Bittner, T.; Webb, R.; Fan, W.; Aiello, A.; Larson, E. & Phyllis, D. (2005). Molecular Characterization of Hand Flora and Environmental Isolates in a Community Settings. *J. Clin. Microbiol*.43(10): 5202- 5207

Padgett, D.; Luque, M.; Rivera, D.; Zepeda, L. & Hernández, A. (2013). Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia en hospital de especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social, 2006-2012. *Rev Med Hondur*. 81(2-4):68- 72.

Peleg, AY.; Seifert, H. & Paterson, DL. (2008). *Acinetobacter baumannii:* emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 21(3): 538–582

Peleg, A. y Hooper, D. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*. 362(19): 1804-1813.

Pitteloud, J.; Villarroel, E.; Figueredo, A. & Silva, M. (2007). *Boletín de infecciones Hospitalarias*. Subcomisión de Infecciones H.U.C. Vol. 19.

Seng, P.; Rolain, JM; Fournier, PE: La, SB; Drancourt, M. & Raoult, D. (2010). MALDITOF–mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*; 5:1733–54.

Ramírez, M.; Aranza, J.; Varela, M.; García, A.; Vélez, G.; Salcedo, R.; Fajardo, M.; Cruz, M. & Moreno, F. (2013). Brote de infección nosocomial de infecciones respiratorias bajas por *Acinetobacter baumannii* en un servicio de medicina interna de un hospital general de la Ciudad de México. *Med. Int. Mex.* 29(3: 250- 256

Richards, M.; Edwards, J.; Culver, D. & Gaynes, R. (2000). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*.21(8):510-5.

Rivas, J.; Guzmán, M.; Redondo, C.; Moncada, L.; Rahn, K.; Machiste, M.; Fernandez, S. & Alonso, G. (2008). Genotipificación de cepas bacterianas aisladas de diferentes centros de salud de Venezuela. *Mem Inst Biol Exp*. 5:105-108.

Rothman, K. (2000) Declaration of Helsinki should be strengthened. *BMJ*. 12; 321(7258):442-445.

Seisdedos, R.; Conde, M.; Castellanos, J.; García, A.; Valenzuela, J. & Fraga, M. (2012). Infecciones relacionadas con el catéter venoso central en pacientes con nutrición parenteral total. *Nutr. Hosp.* 27(3):775-780.

Sevillano, E. y Gallego, L. Molecular techniques for detection and control of nosocomial infections caused by Acinetobacter baumannii. In: Mendez- Vilas A, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2011. p. 495 – 503. http://www.formatex.info/microbiology3/book/495-503.pdf.

Tenover, F.; Arbeit, R.; Goering, R.; Mickelsen, P.; Murray, B.; Persing, D. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2233- 2239.

Toba, F.; Falco, A.; Aranaga, CA & Alonso, G. (2018). Caracterización de bacterias aisladas en un reservorio de agua de Venezuela. Una aproximación a la multiresistencia bacteriana en ambientes

naturales. En: *La contaminación industrial de aguas. Una mirada microbiológica y molecular*. pp- 93-117. Santiago de Cali, Colombia. Editorial USC.

Turton, J.; Woodford, N.; Glover, J.; Yarde, S.; Kaufman, M. & Pitt, T. (2010). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.*44(8):2974- 2976

Vílchez, G. y Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología;* 29: 6-12.

Woodford, N.; Ellington, M.; Coelho, J.; Turton, J.; Ward, M.; Brown, S.; Amyes, S. & Livermore D. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Anitimicrob. Agents*. 27(4): 351- 353.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A COMBINACIONES DE BETA-LACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS EN COLOMBIA

Adriana María Correa Bermúdez*

https://orcid.org/0000-0003-2024-6975

Elsa De La Cadena Vivas**

https://orcid.org/0000-0003-0361-7893

Resumen. Los beta-lactámicos son el grupo de antibióticos que más se utilizan desde los años veinte cuando apareció la benzilpenicilina. Sin embargo, rápidamente aparecieron enzimas que eran capaces de hidrolizar estos antibióticos, lo que llevó al desarrollo de nuevos beta-lactámicos que eran más estables a estas penicilinasas. Posterior al uso de las cefalosporinas de tercera generación aparecieron las Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) que eran capaces de hidrolizar las cefa-

* Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ adriana.corea@usc.edu.co

** Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia
✉ ecadenav@unbosque.edu.co

Para citar este capítulo:

Correa Bermúdez, A. y De La Cadena Vivas, E. Caracterización molecular de aislamientos resistentes a combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas en Colombia. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2021). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas.* (pp. 63- 88). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

losporinas hasta de tercera generación y el aztreonam. Esto impulso el desarrollo de los inhibidores de beta-lactamasas, agentes estables contra las BLEEs y que se combinaron a un betalactámico tradicional. Fue así como aparecieron las combinaciones de ampicilina-sulbactam, amoxacilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. Seguido al incremento en el uso de estos ultimos, empezaron a aparecer aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a estas combinaciones. Estos beta-lactámicos más inhibidores tienen un espectro de acción hacia las beta-lactamasas de espectro reducido y las BLEEs con excepción de las AmpC y las carbapenemasas. La resistencia a los inhibidores reduce las opciones terapéuticas en infecciones por microorganismos productores de beta-lactamasas de espectro reducido y BLEEs, lo que obliga en mayor medida al uso de carbapenémicos con su consecuente aumento de resistencia. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el mecanismo de resistencia en aislamientos resistentes a las combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas. Para esto se procesaron 24 aislamientos, 10 *K. pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca* y 13 *E. coli*. Se confirmó la concentración inhibitoria mínima por E-test, microdilución en caldo y disco difusión. Se realizó PCR para bla_{SHV}, $bla_{TEM,}$ $bla_{CTX-M,}$ bla_{OXA-1} y $bla_{KPC.}$ Adicionalmente se determinó la expresión de genes tipo TEM y SHV por RT-PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que el fenotipo de resistencia a los inhibidores estaba asociado a mecanismos como la hiper-expresión de bla_{TEM} o bla_{SHV}, la presencia de bla_{OXA-1} o $bla_{KPC,}$ y no a la producción de mutantes de tipo TEM-1 o SHV-1 (IRT/IRS) asociados a la resistencia a los inhibidores de beta-lactamasas.

Palabras claves: *Enterobacterales, inhibidores de beta-lactamasas, resistencia a inhibidores.*

Abstract. Beta-lactams are the antibiotics group that have been used since the 1920s when benzylpenicillin appeared. However, enzymes that easily hydrolyzed these antibiotics quickly emerged, leading to the development of new beta-lactams that were more stable to these penicillinases. With the development and use of third generation cephalosporins, appeared the Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) that were capable of hydrolyzing cephalosporins up to third generation. This allowed the introduction of commercial beta-lactamase inhibitors with high affinity for beta-lactamases, acting as 'suicide substrates' of these enzymes, such as sulbactam, clavulanic acid, and tazobactam, stable agents against ESBLs. Nevertheless, bacteria have developed beta-lactamase variants that are able to resist the action of suicide inhibitors. Within this group are the so-called inhibitor-resistant TEM/SHV (IRT/IRS) beta-lactamases. They have been associated with clinical failure with the use of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. Further, reduces the therapeutic options in infections by microorganisms that produce low-spectrum beta-lactamases and ESBLs, which increase the use of carbapenems and its resistance. The objective of this work was to characterize the resistance mechanisms to beta-lactam/beta-lactamases inhibitor combinations. For this, 24 isolates, 10 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca* and 13 *E. coli* were processed. The minimum inhibitory concentration was confirmed by E-test, broth microdilution, and disc diffusion. PCR was performed for bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-1} and bla_{KPC}. Furthermore, the hyperexpression of bla_{TEM} and bla_{SHV} was determined by real-time PCR. The results showed that the inhibitor resistance phenotype was associated with mechanisms such as bla_{TEM} or bla_{SHV} hyperexpression, bla_{OXA-1} or bla_{KPC}, and not with the production of IRT/IRS.

1. Introducción

Desde 1983, año en que se describió por primera vez una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEEs), los reportes fueron aumentando considerablemente en prácticamente todo el mundo (Knothe et al., 1983). Diversos estudios han permitido obtener datos acerca de la prevalencia de las infecciones causadas por *enterobacterales* productores de BLEEs (Coque et al., 2008). En general lo que se observa es que las BLEEs en Europa son por mucho, menos frecuentes en relación con Asia y América Latina, no obstante, son más comunes que en Norteamérica. Estas enzimas se han diseminado tanto en infecciones de origen en la comunidad, como asociadas a la atención en salud. Sin embargo, no se ha establecido una diferenciación clara entre los aislamientos que producen infecciones provenientes de la comunidad o nosocomiales (Coque et al., 2008).

El reporte del *European Antibiotic Resistance Surveillance Sistem* (EARSS) del 2006, en el que participaron alrededor de 800 laboratorios de 31 países, mostró un continuo incremento en los aislamientos de *E. coli y K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación desde el año 2000, con prevalencias superiores al 10% en la mitad de los países participantes (Coque et al., 2008). Adicionalmente, este reporte permitió observar diferencias geográficas importantes entre los países participantes, por ejemplo, en algunas áreas, los aislamientos de *E. coli* portadores de BLEEs estaban por debajo del 1% (Estonia), mientras en otras estaba alrededor del 41% (Rumania); para *K. pneumoniae* estaban entre el 0% (Islandia) hasta el 91% (Rumania) (Coque et al., 2008).

Durante los años noventa en Europa se reportaron brotes hospitalarios por aislamientos de *K. pneumoniae* portadoras de BLEEs, y se encontró que correspondían principalmente a enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Actualmente, se reconoce que ha habido un cambio en

la distribución de las BLEEs debido a un aumento en la aparición de enzimas tipo CTX-M sobre las derivadas de TEM y SHV (Coque et al., 2008; Correa et al., 2015). La emergencia y amplia diseminación de la variante CTX-M 15 asociada al clon de alto riesgo ST131 en la mayoría de países europeos es uno de los aspectos más relevantes asociados a la epidemiología de las BLEEs en Europa (Cantón et al., 2012; Mathers et al. 2015). Esta beta-lactamasa ha sido asociada a infecciones producidas por microorganismos de origen en la comunidad como se ha documentado en diferentes estudios (Dautzenberg et al., 2016; Peirano et al., 2010). Otras variantes de CTX-M son importantes en algunos países, como CTX-M 9 y CTX-M 10 en España, CTX- 14 en Portugal y España, CTX-M 3 en los países del este y CTX-M 5 en Rusia. Dentro de las enzimas tipo SHV la más prevalente es SHV-12 la cual se ha asociado a aislamientos nosocomiales de *K. pneumoniae* en Italia, Polonia y España. En cuanto a las enzimas derivadas de TEM, son importantes TEM-3 y TEM-4 que están asociadas a clones epidémicos de *K. pneumoniae* en Francia y España, mientras TEM-24 está asociado a cepas de *Klebsiella aerogenes* en Bélgica, Francia Portugal y España. Actualmente estas enzimas han sido, además, caracterizadas en aislamientos de *P. mirabilis* causantes de infecciones proveniente de la comunidad (Coque et al., 2008).

Aunque existen pocos estudios sobre la prevalencia y distribución de las BLEEs en Asia, algunos de ellos reportan que las BLEEs se han distribuido ampliamente entre los enterobacterales. En el estudio SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* (1998-2002), se demostró que la prevalencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs fue más alta en Singapur y China (35,6% y 30,7% respetivamente), seguida por Filipinas, Taiwán, Hong Kong y Japón. Los aislamientos de *E. coli* productora de BLEEs se presentaron en China principalmente con un 24,5%, seguidos por Hong Kong (14,3%), Singapur (11,3%), Taiwán, Filipinas y Japón (Sader et al., 2019).

En Estados Unidos, los resultados obtenidos en el TEST (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) entre los años 2005 a 2007 para aislamientos de *K. pneumoniae, K. oxytoca, E. coli, K. aerogenes, E. cloacae, S. marcescens, A. baumannii y P. aeruginosa* obtenidos de 172 centros, arrojaron como resultado que del total de aislamientos de *K. pneumoniae* (1486) el 7,3 % eran productores de BLEEs para el 2005, el 11,6% para el 2006 y 7,7% para el 2007, con una tasa media de 8,9% en los tres años (Coque et al., 2008). Muy pocas *K. oxytoca* fueron identificadas como productoras de BLEEs, tan solo el 3,8% (9/303), 1,8% (5/282) y 1,4% (3/216) para los años 2005, 2006 y 2007 respectivamente, con una tasa media de 2,1% para los tres años (Dowzicky et al., 2008).

El primer reporte de BLEEs en Latinoamérica se realizó en Chile, en el año 1985, y se debió a un aislado de *K. pneumoniae* con SHV-5 (Gutmann et al., 1989). En América Latina, estudios realizados por SENTRY y el TEST reportaron que la frecuencia de microorganismos productores de BLEEs es mucho más alta en esta zona que en el resto del mundo. Se ha reportado que aproximadamente el 45% de las *K. pneumoniae* y el 8,5% de *E. coli* presentan fenotipos característicos de BLEEs (Villegas et al., 2004; Casellas et al., 2003). En Argentina, por ejemplo, existen estudios que demuestran que la enzima más prevalente en infecciones hospitalarias es CTX-M 2, la cual corresponde al 67% de las beta-lactamasas presentes en los aislamientos; PER-2 fue detectada en un 18%, mientras las derivadas de SHV ocuparon el tercer lugar, pero se encontraron casi exclusivamente en aislamientos de *K. pneumoniae* (Casellas et al., 2003; Quinteros et al. 2003). En Colombia, las BLEEs han sido reportadas desde 1990, y se ha observado una alta prevalencia de estas enzimas en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, con tasas similares a las reportadas en otros países latinoamericanos, aunque en algunas regiones las tasas son significativamente más altas, 71,4% para K. *pneumoniae* y 16,7% para *E. coli* en unidades de cuidado intensivo (Villegas et al., 2004).

Enzimas resistentes a inhibidores

Con la rápida diseminación e incremento en las infecciones por aislamientos productores de BLEEs se dio un incremento en el uso de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas; lo que llevó a la aparición de aislamientos resistentes a los inhibidores a principios de los 90s (Bradford PA, 2001). Esta resistencia se puede deber a la producción de mutantes de BLEEs tipo TEM o SHV que son resistentes a los inhibidores, pero tienen menor acción hidrolítica contra las cefalosporinas (Chaïbi et al., 1999). Otros mecanismos que pueden conferir resistencia a los inhibidores clásicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) incluyen la adquisición de AmpC plasmídico, híper-producción de AmpC cromosomal intrínseca de *E. coli*, producción de algunas variantes de enzimas tipo OXAs resistentes a los inhibidores e incluso baja expresión de enzimas tipo KPC (Kaye et al., 2004).

Una de las principales funciones del laboratorio de microbiología es suministrar información al clínico respecto del perfil de susceptibilidad de los aislamientos causantes de la infección, que permita orientar una terapia acertada y oportuna. Un análisis detallado del perfil de susceptibilidad a los antibióticos ayuda a detectar posibles mecanismos de resistencia que pueden pasar inadvertidos o errores en la interpretación del fenotipo que pueden llevar a un reporte erróneo (Cantón et al., 2001). Aislamientos susceptibles a las cefalosporinas con fenotipo de resistencia a los inhibidores (IRT/IRS) están conformados por un grupo de variantes de TEM y SHV resistentes a las aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, e inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Pei-jun et al., 1995). Estas enzimas afectan más a ampicilina-sulbactam y amoxacilina-ácido clavulánico, pero en ocasiones pueden llegar a afectar incluso a piperacilina-tazobactam. Se han reportado con mayor frecuencia en aislamientos de *E. coli*, pero también en *K. pneumo-*

niae, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii* y *Shigella sonnei*. Este tipo de resistencia solo se puede inferir en aislamientos que naturalmente son sensibles a la combinación de beta-lactámico/inhibidor de beta-lactamasas, no en aislamientos que portan naturalmente AmpC cromosomal inducible como *E. cloacae y C. freundii*.

Los inhibidores de las beta-lactamasas de la clase A tienen una gran afinidad por estas enzimas, actuando como inhibidores suicidas y protegiendo de esta forma al antibiótico de ser hidrolizado (Bush et al., 2016). El aumento en el uso de estos inhibidores llevó a que aparecieran variantes de TEM resistentes a los inhibidores a los que se denominaron IRT *(inhibition resistant TEM*). Posteriormente aparecieron variantes de SHV (*Inhibition Resistant SHV-* IRS) y CTX-M que igualmente eran resistentes a los beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas. Cuando se detectan estos aislamientos con fenotipo IRT/IRS se debe evitar el uso de la combinación de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas, pero todavía podrían utilizarse otros beta-lactámicos dependiendo del resultado del antibiograma, el estado clínico del paciente y el sitio de infección. En aislamientos portadores de BLEEs y que adicionalmente presentan el fenotipo IRT/IRS se ven reducidas las opciones terapéuticas.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el mecanismo de resistencia en un grupo de aislamientos resistentes a las combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas provenientes de cinco ciudades de Colombia.

2. Materiales y métodos

Se recibieron 24 aislamientos de seis hospitales en cinco ciudades de Colombia recolectados durante el 2010 con resistencia a alguna de las combinaciones de betalactámico/inhibidor de beta-lactamasas.

Los aislamientos fueron re-identificados por Vitek 2 (*BioMerieux, Marcy l' Etoile, France*) y se confirmó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución en caldo (Sensititre panels; TREK Diagnostic Systems, England). Se confirmó la CIM de amoxacilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefalotina y cefoxitin por E-test (*BioMerieux, Marcy l' Etoile, France*) y difusión con disco. Se realizó prueba fenotípica para descartar la producción de carbapenemasas y PCR para bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-1} y $bla_{KPC.}$ Los genes positivos para bla_{SHV} y bla_{TEM} fueron secuenciados para identificar las variantes de TEM y SHV resistentes a los inhibidores (IRT/IRS). Se realizó RT-PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) para detectar el nivel de expresión de bla_{TEM} o bla_{SHV}. Como control de calidad se utilizaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922™ y *Escherichia coli* 35218™.

3. Resultados

En la tabla 4 se muestran las CIM de los 24 aislamientos. Todos los aislamientos eran susceptibles a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y ertapenem, excepto el aislamiento No 15 que tenía una CIM resistente a aztreonam (16 mg/l). El 37,5% (9/24) de los aislamientos eran no susceptibles a piperacilina/tazobactam, 96% (23/24) no susceptibles a ampicilina/sulbactam y 91,3% (21/23) no susceptible a amoxacilina/clavulanato. Al confirmarse la susceptibilidad, uno de los aislamientos fue susceptible a todas las combinaciones de beta-lactámico/inhibidor de beta-lactamasas. El 50% (12/24) de los aislamientos fueron resistentes a ampicilina/sulbactam y amoxacilina/clavulanato simultáneamente, y el 33,3% (8/24) fueron resistentes a los tres inhibidores (Fig. 4). Todos los aislamientos fueron susceptibles a cefoxitin mientras la cefalotina fue no susceptible en el 91,6% (22/24) de los aislamientos. La prueba de tamizaje para carbapenemasas resultó negativa para todos los aislamientos, excepto un aislamiento que resultó portador de $bla_{KPC.}$ Dos aislamientos fueron positivos para bla_{oxa-1}.

Un total de 9/10 aislamientos de *K. pneumoniae* tenían bla_{SHV-1}, 4 de los cuales híper-expresaban la beta-lactamasa, 12/13 aislamientos de *E. coli* tenían bla_{TEM-1}, al igual que uno de los aislamientos de *K. pneumoniae*. El otro aislamiento de *E. coli* solo fue positivo para bla_{OXA-1}. De los 13 aislamientos con bla_{TEM-1}, 5 híper-expresaban la enzima. De los 9 aislamientos que híper-expresaban bla_{TEM-1} o bla_{SHV-1}, 8 fueron resistentes a los tres inhibidores (Figura 5 - Tabla 5). Uno de los aislamientos de *E. coli* mostró una expresión de bla_{TEM-1} por debajo de lo normal, este aislamiento resultó portador de $bla_{OXA-1.}$ En el caso del aislamiento de *K. pneumoniae* con baja expresión de bla_{SHV-1}, este aislamiento fue positivo para bla_{KPC}.

Al analizar las secuencias y compararlas con las secuencias reportadas en el Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) ninguno de estos aislamientos resulto ser una IRT/IRS.

4. Discusión

El uso de la combinación de betalactámico/inhibidor de beta-lactamasas para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos Gram negativos productores de BLEEs es muy controversial hoy en día (Schuetz et al., 2018). El fenotipo IRT/IRS confiere resistencia a los inhibidores, en mayor grado a amoxacilina/clavulanato y ampicilina/sulbactam, y afecta en menor grado a piperacilina/tazobactam, mientras la actividad de las cefalosporinas no se ve afectada. Detectar estos mecanismos de resistencia es difícil y más cuando se presenta con otros mecanismos de resistencia como BLEEs, hiper-expresión de de TEM-1 o SHV-1, incluso las IRT/IRS cuando las bacterias también cierran porinas.

Tabla 4. Resultados del perfil de susceptibilidad antimicrobiana (mg/l)

No	ID	MUESTRA	SALA	TZP	AMS	AMC	FOT	AXO	CAZ	AZT	FEP	ERT
1	eco	ORINA	CEX	4	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
2	eco	ORINA	CEX	32	64	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
3	eco	ORINA	CEX	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
4	eco	SANGRE	UCIA	16	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
5	eco	ORINA	URG	4	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
6	kpn	TGI	H 6 P	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
7	kpn	ORINA	H 5P OR	8	128	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
8	kpn	ORINA	H 4P OR	2	16	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
9	kpn	HDA QX	H 4P OR	>128	>256	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
10	kpn	ORINA	UCI A	16	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
11	eco	ORINA	UCI A	8	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
12	kpn	HDA QX	p9	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
13	kpn	SANGRE	H4P	4	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
14	kpn	ORINA	CEX	2	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
15	kox	HDA QX	P 3	>128	128	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
16	Kpn	TEJODP	H2P	2	64	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
17	eco	ORINA	CEXT	2	8	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
18	eco	ORINA	URG	>128	>256	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
19	eco	ORINA	cext	2	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
20	eco	ORINA	CEXT	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
21	eco	ORINA	URG	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
22	eco	ORINA	URG	8	128	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
23	eco	SOT	UCI P	8	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
24	kpn	ORINA	MI	2	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5

Abreviaturas: TZP: Piperacilina/tazobactam, AMS: Ampicilina/Sulbactam, AMC: Amoxacilina/Clavulanato, FOT: Cefotaxime, CAZ: Ceftazidime, AXO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidime, AZT: Aztreonam, FEP: Cefepime, ERT: Ertapenem. Eco: *E. coli*, Kpn: *K. pneumoniae*, Kox: *K. oxytoca*. TGI: Tracto Gastrointestinal, HDA QX: Herida Quirúrgica, SOT: Secreción Orotraqueal, CEX: Consulta Externa, URG: Urgencias, HOSP: Salas de Hospitalización General, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, UCIP: Unidad de Cuidados Pediátricos.

Fuente: Elaboración propia.

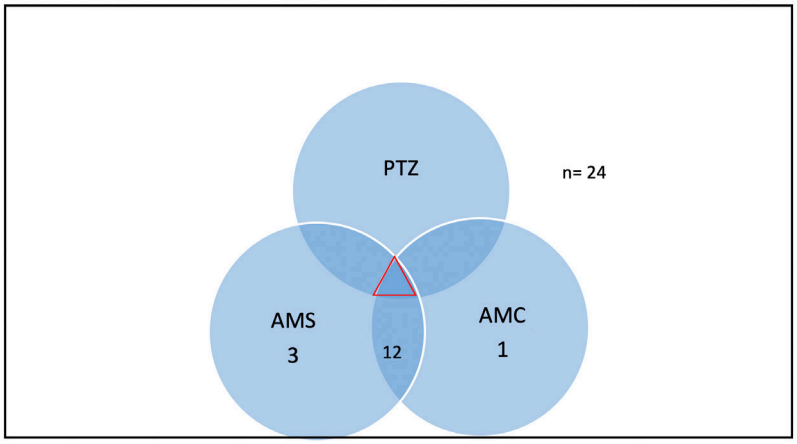
Tabla 5. Resultados de las pruebas moleculares para *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{OXA-1}$ y *bla*$_{KPC}$

No	Ciudad	ID	CEF	TZP	AMS	AMC	FOX	TEM-1	SHV-1	CTX-M	OXA-1	KPC
1	Cali	kpn	I	4	64	16	S	-	+	-	-	-
2	Cali	kpn	R	32	64	8	S	-	+	-	-	-
3	Cali	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
4	Cali	eco	R	16	32	16	S	-	-	-	+	-
5	Cali	eco	R	4	32	16	S	+	-	-	-	-
6	Cali	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
7	Cali	eco	R	8	128	32	S	+	-	-	-	-
8	Cali	eco	R	2	16	16	S	+	-	-	-	-
9	Cali	eco	R	>128	>256	16	S	+	-	-	-	-
10	Cali	kpn	R	16	64	32	S	-	+	-	-	+
11	Cali	eco	R	8	64	32	S	+	-	-	-	-
12	Pereira	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
13	Pereira	eco	R	4	64	32	S	+	-	-	-	-
14	Barranquilla	kpn	R	2	32	16	S	-	+	-	-	-
15	Bogotá	kox	R	>128	128	32	S	-	-	-	-	-
16	Bogotá	kpn	R	2	64	8	S	+	-	-	-	-
17	Pereira	eco	R	2	8	8	S	+	-	-	-	-
18	Bucaramanga	kpn	S	>128	>256	16	S	-	+	-	-	-
19	Bogotá	eco	S	2	64	16	S	+	-	-	-	-
20	Bogotá	eco	R	>128	>256	32	S	+	-	-	-	-
21	Bogotá	eco	R	>128	>256	32	S	+	-	-	-	-
22	Bogotá	eco	R	8	128	16	S	+	-	-	+	-
23	Barranquilla	kpn	R	8	64	16	S	-	+	-	-	-
24	Bogotá	eco	I	2	64	16	S	+	-	-	-	-

Abreviaturas: TZP: piperacilina/tazobactam, CEF: cefalotina, AMS: ampicilina/sulbactam, AMC: amoxacilina/clavulanato, FOX: cefoxitin. Eco: *E. coli*, Kpn: *K. pneumoniae*, Kox: *K. oxytoca*.

Fuente: Elaboración propia.

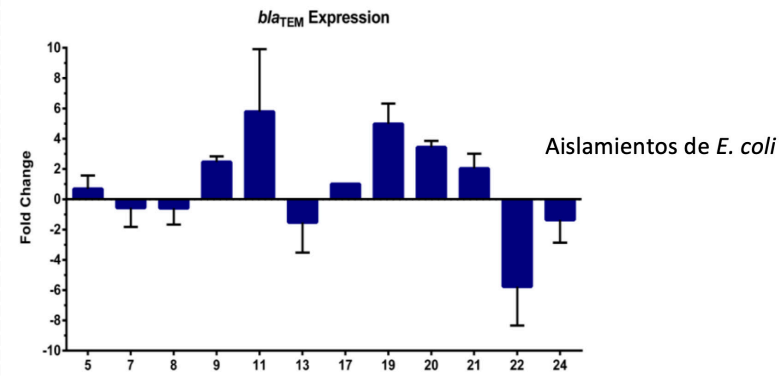
Figura 4. Distribución de los aislamientos resistentes

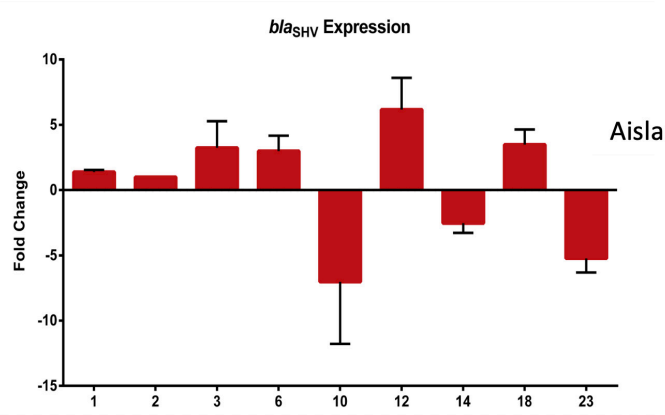


Abreviaturas: PTZ: piperacilina/tazobactam, AMS: Ampicilina/Sulbactam, AMC: Amoxacilina/Ácido clavulánic

Fuente: Elaboración propia.

Figura 5. Expresión de *bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{SHV}$ por RT-qPCR en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*





Fuente: Elaboración propia.

Ninguno de los 24 aislamientos analizados en este estudio tenía enzimas tipo TEM o SHV asociadas al fenotipo IRT/IRS. Al igual que lo que se ha reportado en Europa el fenotipo de resistencia a inhibidores en nuestro país no está asociado a la presencia de IRT/IRS; se debe en mayor medida a la híper-expresión de bla_{TEM-1} *o* bla_{SHV-1}, y en menor medida a la presencia de enzimas tipo OXA-1 o KPC. En un estudio realizado en España con 3.556 aislamientos de E. coli encontraron que el 4,3% de estos eran resistentes a ampicilina-sulbactam. De estos, el 12% de esta resistencia se debía a la presencia de IRTs, el 61% se debía a la hiper- expresión de bla_{TEM-1}, portadores de BLEEs (15%), hiper-expresión de la AmpC constitutiva o AmpC adquirida (12%). Adicionalmente se encontraron discrepancias en la categorización de los inhibidores dependiendo de la metodología utilizada (Martín et al. 2010). En otro estudio realizado por Picazo et al., en el 2015 de 70 aislamientos de *E. coli* resistentes a amoxacilina/ácido clavulánico, el 40% tenía enzimas tipo IRT. Todos los aislamientos provenían de infección urinaria, de estos el 75% tenían origen en la comunidad, y el 25% eran infecciones hospitalarias (Ríos et al., 2015). En general la resistencia a los inhibidores se ha descrito más en aislamientos de *E. coli* causantes de infección urinaria (Mukherjee et al.,

2018). Esto podría ser consecuencia del uso frecuente de la combinación de beta-lactámicos- inhibidores de beta-lactamasas.

De los 24 aislamientos, nueve (37,5%) hiper-expresaban $bla_{\text{TEM-1}}$ o $bla_{\text{SHV-1}}$, lo que explica el fenotipo de resistencia a inhibidores. Promotores fuertes, además de mutaciones en estos promotores le permiten a la enzima extender su espectro de hidrólisis e incrementar la concentración inhibitoria mínima de los inhibidores, especialmente amoxacilina/ácido clavulánico y ampicilina/sulbactam (Robin et al., 2005). En aislamientos de *K. pneumoniae* se ha reportado que mutaciones en SHV-1, enzima cromosomal e intrínseca en *K. pneumoniae* y responsable de la resistencia natural a ampicilina en este microorganismo pueden aumentar la expresión de la enzima y conferir resistencia a los inhibidores (Dubois et al., 2008).

El aislamiento de *K. pneumoniae* portador de bla_{KPC} era resistente a ampicilina/sulbactam, amoxacilina/ácido clavulánico y cefalotina; y susceptible al resto de los antibióticos beta-lactámicos. Aislamientos portadores de bla_{KPC} pueden observarse fenotípicamente sensibles por una baja expresión del gen, presencia de promotores débiles o bajo número de copias del gen, pero pueden afectar la combinación con inhibidores confiriendo resistencia. Dos aislamientos de *E. coli* eran productores de OXA-1, estos aislamientos pueden tener adicionalmente susceptibilidad reducida a cefepime y pueden presentar discrepancias en el perfil de susceptibilidad e identificación del mecanismo de resistencia por los sistemas expertos de los equipos automatizados (Cantón et al., 2001). En aislamientos portadores de estos genes debería evitarse el uso de cefepime, especialmente si la enzima está híper-producida y se observa susceptibilidad reducida en la CIM in vitro. Ninguno de los aislamientos tenía una AmpC adquirida. En el caso de los aislamientos de *E. coli*, son portadores de una AmpC intrínseca que se expresa normalmente en muy

bajo nivel, la hiper-expresión de esta enzima se ha asociado con resistencia a los inhibidores, sin embargo, en este estudio no se examinó la expresión de AmpC. El aislamiento No 15, *K. oxytoca* era resistente a los inhibidores y a aztreonam (Tabla 4). Este aislamiento dio negativo para todos los genes buscados. *K. oxytoca* es portador de una enzima denominada K1, que es intrínseca y le confiere resistencia natural a ampicilina. K1 tiene especial predilección por aztreonam, y su híper-expresión podría elevar la CIM del mismo, sin embargo, en este estudio no se tamizó K1.

Veinte de los aislamientos resultaron no susceptibles a cefalotina, esta resistencia a las cefalosporinas de primera generación se ha asociado más a la resistencia a inhibidores debido a otros mecanismos distintos de IRT/IRS; aislamientos con fenotipo IRT/IRS tienden a ser susceptibles a cefalotina.

La piperacilina/tazobactam conserva la actividad inhibitoria contra la mayoría de aislamientos resistentes a los inhibidores, con contadas excepciones (Bonomo et al., 1997). Esta es una de las combinaciones más utilizadas contra estas infecciones, sin embargo, su eficacia ha sido muy discutida, y algunos estudios muestran resultados contradictorios. Mientras algunos muestran que tiene una buena actividad en infecciones urinarias, y podría tenerla en otro tipo de infeciones con CIM dentro del rango sensible, otros estudios han encontrado una eficacia reducida y altas tasas de mortalidad, especialmente en infecciones severas como bacteriemias. Adicionalmente a esto presenta discrepancias en los resultados de susceptibilidad (Esparza et al., 2019).

Las combinaciónes de beta-lactámico/inhibidores de beta-lactamasas son muy usadas en infecciones urinarias, infecciones de piel y tejido blanco, neumonía adquirida en la comunidad y bacteriemia, especialmente cuando se sospecha de *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años se ha visto un

aumento de la resistencia a inhibidores (Cantón et al., 2008). La presencia de microorganismos con fenotipo IRT/IRS se ha asociado con falla clínica, especialmente en infecciones urinarias. La opción terapéutica en estos aislamientos es mayor que en otros casos, excepto que se presente con otros mecanismos, como por ejemplo presencia de BLEEs. Un estudio en Estados Unidos encontró que el fenotipo IRT era producido por hiper-producción de TEM o AmpC más que por IRT. En este estudio se encontró que el uso previo de ampicilina/sulbactam era un factor de riesgo para desarrollar resistencia a los inhibidores (Waltner-Toews et al. 2011). Esto podria indicar que el uso de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas ha llevado al incremento en su resistencia, y que durante el uso de estas combinaciones en aislamientos previamente susceptibles la hiper-expresión de enzimas tipo TEM y SHV podría llevar a una falla terapéutica dependientdo de factores como el sitio de infección e inóculo.

5. Agradecimiento

Al Grupo de Resistencia Bacteriana perteneciente al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) en donde fue desarrollado este trabajo.

Bibliografía

Bonomo, R. A.; S. A. Rudin y D. M. Shlaes (1997). "Tazobactam Is a Potent Inactivator of Selected Inhibitor-Resistant Class A β-Lactamases." *FEMS Microbiology Letters* 148 (1):59–62. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00013-X.

Bradford ,PA. (2001). "Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threa." *Clinical Microbiology Reviews* 14 (4):933–51. https://doi.org/10.1128 /CMR .14.4.933.

Bush, Karen y Patricia A. Bradford (2016). *B -Lactams and B -Lactamase Inhibitors: An Overview*, No. Table 1.

Cantón, R.; M. I. Morosini; O. Martin; S. De La Maza & E. Gomez G. De La Pedrosa. (2008). "IRT and CMT β-Lactamases and Inhibitor Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 14 (SUPPL. 1):53–62. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x.

Cantón, R.; González-Alba, J. y Galán, J. (2012). "CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion." *Frontiers in Microbiology 3* (APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110.

Cantón, R.; Pérez-Vázquez, M.; Oliver, A.; Coque, TM.; Loza, E.; Ponz, F. & Baquero, F. (2001). "Validation of the VITEK2 and the Advance Expert System with a Collection of Enterobacteriaceae Harboring Extended Spectrum or Inhibitor Resistant β-Lactamases." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 41 (1–2):65–70. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00286-3.

Casellas, JM.; Tomé, G.; Bantar, C.; Bertolini, P.; Blázquez, N.; Borda, N.; Couto, E.; et al. (2003). "Argentinean Collaborative Multicenter Study on the in Vitro Comparative Activity of Piperacillin-Tazobactam against Selected Bacterial Isolates Recovered from Hospitalized Patients." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47 (3):527–37. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00131-7.

Chaïbi, E. B.; D. Sirot; G. Paul & R. Labia (1999). "Inhibitor-Resistant TEM β-Lactamases: Phenotypic, Genetic and Biochemical Characteristics." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 (4):447–58. https://doi.org/10.1093/jac/43.4.447.

Coque, T M; F Baquero y R Canton (2008). "Increasing Prevalence of ESBL - Producing Enterobacteriaceae in Europe." *Eurosurveillance* 13 (47):1–11.

Correa, A., del Campo, R., Perenguez, M., Blanco, V. Rodríguez-Baños, M., Perez, F., Maya, J. et al. (2015). "Dissemination of High-Risk Clones of Extensively Drug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa in Colombia." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (4):2421–25. https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14.

Dautzenberg, M. J.D., M. R. Haverkate, M. J.M. Bonten, & M. C.J. Bootsma. 2016. "Epidemic Potential of Escherichia Coli ST131 and Klebsiella Pneumoniae ST258: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMJ Open* 6 (3). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009971.

Dowzicky, MJ & Park, CH. (2008). Update on antimicrobial susceptibility rates among gram-negative and gram-positive organisms in the United States: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) 2005 to 2007. Clin Ther. 2008;30(11):2040-2050.

Dubois, V.; Poirel, L.; Demarthe,, F.; Arpin, C.; Coulange, L.; Minarini, LA.; Bezian, MC.; Nordmann, P. & Quentin, C. (2008). "Molecular and Biochemical Characterization of SHV-56, a Novel Inhibitor-Resistant β-Lactamase from Klebsiella Pneumoniae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10):3792–94. https://doi.org/10.1128/AAC.00387-08.

Esparza, G.; Villegas, MV.; Vega, S.; en nombre de los Comités de Microbiología & PROA y Resistencia de la Asociación Panamericana de Infectología (API) y de Antimicrobianos (2019). "Recomendaciones sobre el tamizaje y uso de Piperacilina/tazobactam En Infecciones por Productores de Betalactamasas de Espectro Extendido (βLEEs)." *Rev Panam* Enf Inf 0 (0):1–3.

Gutmann, L.; B. Ferre; F. W. Goldstein; N. Rizk; E. Pinto-Schuster; J. F. Acar & E. Collatz (1989). "SHV-5, a Novel SHV-Type β-Lactamase That Hydrolyzes Broad-Spectrum Cephalosporins and Monobactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (6):951–56. https://doi.org/10.1128/AAC.33.6.951.

Kaye, KS, Gold, HS, Schwaber, MJ, et al. (2004). "Variety of β-Lactamases Produced By.pdf." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:1520–25.

Knothe, H.; Shah, P.; Krcmery, V.; Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983). "Transferable Resistance to Cefotaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia Marcescens*." *Infection* 11 (6):315–17. https://doi.org/10.1007/BF01641355.

Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N.; Rodriguez, M. M.; Costa, N.; Korbenfeld, D.; Couto, E.; Gutkind, G. & Microbiology Study Group (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2864–2867. https://doi.org/10.1128/aac.47.9.2864-2867.2003

Martín, O.; Valverde, A.; Morosini, MI.; Rodríguez-Domínguez, M.; Rodríguez-Baños, M.; Coque, TM.; Cantón, R.; del Campo, R. (2010). "Population Analysis and Epidemiological Features of Inhibitor-Resistant-TEM-β-Lactamase-Producing Escherichia Coli Isolates from Both Community and Hospital Settings in Madrid, Spain." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (7):2368–72. https://doi.org/10.1128/JCM.00608-10.

Mathers, AJ; Peirano, G; Pitout, JD. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-591. doi:10.1128/CMR.00116-14

Mukherjee, SK.; Mandal, RS.; Das, S.; Mukherjee, M. (2018). Effect of non-β-lactams on stable variants of inhibitor-resistant TEM β-lactamase in uropathogenic Escherichia coli: implication for alternative therapy. *J Appl Microbiol*. 2018;124(3):667-681. doi:10.1111/jam.13671

Peirano, G . y Johann, D. D. Pitout. (2010). "Molecular Epidemiology of *Escherichia Coli* Producing CTX-M B-Lactamases: The Worldwide Emergence of Clone ST131 O25: H4." *International Journal of Antimicrobial Agents*. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003.

Ríos, E; López, MC; Rodríguez-Avial, I; Pena, I; Picazo, JJ. (2015). Characterization of Inhibitor-Resistant TEM β-Lactamases and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli Isolates. *Microb Drug Resist*. 2015;21(5):512-515. doi:10.1089/mdr.2015.0039

Robin, F.; J. Delmas; C. Chanal; D. Sirot; J. Sirot & R. Bonnet (2005). "TEM-109 (CMT-5), a Natural Complex Mutant of TEM-1 β-Lactamase Combining the Amino Acid Substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11):4443–47. https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4443-4447.2005.

Sader, HS.; Rhomberg, PR.; Fuhrmeister, AS.; Mendes, RE.; Flamm, RK.; Jones, RN. (2019). Antimicrobial Resistance Surveillance and New Drug Development. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(Suppl 1):S5-S13. Published 2019 Mar 15. doi:10.1093/ofid/ofy345

Schuetz, AN; Reyes, S.; Tamma, PD. (2018). "Crossm Positive Organisms". *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 56 (3):1–8.

Stapleton, P.; Wu, P. J.; King, A.; Shannon, K.; French, G. & Phillips, I. (1998). Incidence and Mechanisms of Resistance to the Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2773..

Villegas, MV.; Correa, A.; Perez, F.; Miranda, MC.; Zuluaga, T. & Quinn, JP. (2004). "Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamases in Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli Isolates from Colombian Hospitals". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49 (3):217–22. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.001.

Waltner-Toews RI.; Paterson, DL.; Qureshi, ZA.; et al. (2011). Clinical characteristics of bloodstream infections due to ampicillin-sulbactam-resistant, non-extended- spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and the role of TEM-1 hyperproduction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):495-501. doi:10.1128/AAC.00797-10

CAPÍTULO 4

DISEMINACIÓN DE CLONES DE ALTO RIESGO EN *K. pneumoniae* PORTADORA DE CARBAPENEMASA TIPO KPC EN COLOMBIA

Adriana María Correa Bermúdez*

https://orcid.org/0000-0003-2024-6975

Marcela Perenguez**

https://orcid.org/0000-0002-5751-5211

Resumen. *Klebsiella pneumoniae* ha sido identificada como uno de los principales microorganismos en infecciones asociadas en la atención en salud en Colombia; sin embargo, el aumento de la resistencia en este microorganismo ha venido en aumento en los últimos 10 años. Esta resistencia ha sido asociada a la presencia de enzimas tipo beta-lactamasas, especialmente, las de tipo carbapenemasas. La carbapenemasa más prevalente en este microorganismo es sin duda alguna la carbapenemasa tipo KPC por sus siglas en inglés, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

* Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ adriana.corea@usc.edu.co

** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ marcela025@gmail.com

Para citar este capítulo:

Correa Bermúdez A. y Perenguez, M. Diseminación de clones de alto riesgo en *K. pneumoniae* portadora de carbapenemasa tipo KPC en Colombia. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2021). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas.* (pp. 87- 121). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

El éxito de su diseminación ha sido asociado a la presencia de clones denominados de alto riesgo y durante el 2009 se observó en Colombia la presencia varios clones entre ellos los ST258 y ST512; razón por la cual el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de clones de alto riesgo, sus características genéticas asociadas a la presencia de genes *bla* y su diseminación en cepas de *K. pneumoniae* portadoras de KPC en hospitales de Colombia. Para ello, se realizó un estudio observacional, utilizando 124 aislados MDR (uno por paciente) del banco de cepas del Grupo de Estudio de la Resistencia Nosocomial en Colombia de CIDEIM. Se realizó el diagnóstico de los genes *bla* utilizando el protocolo de qPCR (bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{NDM} bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTXM}) previamente estandarizado en CIDEIM y secuenciación Sanger para la identificación de las variantes de estos genes. Para la tipificación molecular se utilizó electrophoresis de campos pulsados (PFGE por sus siglas en ingles de *pulsed field gel electrophoresis*) y *Multilocus Sequence Typing* - MLST y finalmente para la caracterización de plásmidos se utilizó PFGE-S1 y PCR-replicon typing – PRT. Los resultados mostraron que los 124 aislados eran portadores del gen bla_{KPC}, y no se presentó co-expresion con otras carbapenemasas analizadas. Las variantes identificadas fueron KPC-2 y KPC-3. Los resultados de PFGE mostraron siete diferentes grupos de pulsotipos (PTG) dentro de los cuales el PTG5 contiene 85 de los aislados analizados y los resultados de MLST identificaron los ST258 y ST512 asociados a la diseminación de KPC-3; mientras que se observó una gran variabilidad asociada a la diseminación de KPC-2. Adicionalmente, se encontró una gran variabilidad de plásmidos en los aislados analizados. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que la introducción del ST258 generó una expansión clonal para el gen bla_{KPC-3} que comenzó a desplazar el gen $bla_{KPC-2,}$ el cual se asocia más a una alta diseminación plasmídica.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Multilocus Sequence Typing*, clones de alto riesgo.

Abstract. The knowledge of multidrug-resistant microorganisms (MDR) that cause infectious diseases is one of the main pillars of infection control. The main strategies used to achieve this purpose are active surveillance, and the detection of resistance mechanisms and virulence factors. Within all microorganisms, bacteria are recognized as the main causal infectious agents, not only at hospital level, but also in the community. Gram-negative bacteria are the most prevalent bacteria in Latin America, and particularly multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae cause the greatest impact in public health. This is due to the fact that these organisms have been associated with high rates of morbidity and mortality, increase in hospital stay and higher healthcare costs. β-lactamases have been considered the central mechanisms of resistance of the aforementioned bacteria. Even though a wide variety of β-lactamase classes have been identified, the most important, due to significant clinical impact, are the Klebsiella pneumonia carbapenemase (KPC). According to this information, an observational study was performed, using 124 MDR isolates (one per patient) from the strain bank of the CIDEIM nosocomial resistance in Colombia study group. The bla genes were diagnosed using the qPCR protocol (bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{NDM} bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTXM}) previously standardized at CIDEIM and sequencing to identify the variants of these genes. For molecular typing, pulsed field electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing - MLST were used, and finally, for the characterization of plasmids, PFGE-S1 and PCR-replicon typing - PRT were used. The results showed that of the 124 isolates as carriers of the bla_{KPC} enzyme, there was no co-expression with other carbapenemases analyzed. The variants identified were KPC-2 and KPC-3. The PFGE results showed 7 different groups of pulsotypes (PTG) within which the PTG5 contains 85 of the analyzed isolates and the

MLST results identified the ST258 and ST512 associated with the KPC-3 spread; while a great variability associated with the spread of KPC-2 was observed. Additionally, a great variability of plasmids was found in the isolates analyzed. The results obtained in this investigation allow us to conclude that the introduction of ST258 generated a clonal expansion for the bla_{KPC-3} gene that began to displace the bla_{KPC-2} gene, which is more associated with high plasmid dissemination.

1. Introducción

Las infecciones bacterianas causadas por microorganismos multi-resistentes (MDR) y con resistencia extendida (XDR) son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Alós, 2015; Morehead y Scarbrough, 2018). Las infecciones causadas por estos microorganismos han mostrado un gran impacto en la salud pública, asociadas con altas tasas de morbi-mortalidad y altos costos en la atención en salud. La presencia de enzimas beta-lactamasas, como carbapenemasas, se ha descrito como el mecanismo de resistencia más prevalente entre ellas y el de mayor impacto clínico (van Duin y Doi, 2017).

La propagación mundial de estas enzimas se ha atribuido a la presencia de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) que generalmente llevan consigo múltiples genes de resistencia o factores de virulencia. Estos elementos han sido diseminados por linajes de bacterias consideradas exitosas por su capacidad de adaptarse y mantenerse por periodos prolongados de tiempo en el medio hospitalario. Estos linajes bacterianos, caracterizados molecularmente por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), han sido denominados clones de alto riesgo (*high risk clones*) (Woodford et al., 2011). En Colombia, estudios previos han identificado la presencia de clones de alto riesgo, pero en un período de tiempo corto

durante el 2009, alertando sobre el posible riesgo epidemiológico de su diseminación a nivel nacional (Mojica et al., 2012).

En el 2013 el CDC público el estado del arte de los principales microorganismos multirresistentes en Estados Unidos, estima que más de dos millones de personas se infectan cada año por organismos multirresistentes y entre ellos está *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos (Solomon y Oliver, 2014). *K. pneumoniae* es un patógeno nosocomial responsable de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones en piel y tejidos blandos, y bacteriemias (Podschun y Ullmann, 1998), principalmente en las unidades de cuidado intensivo (UCI) y las unidades de neonatos. Posee una gran capacidad de causar brotes hospitalarios posiblemente por poseer múltiples factores de virulencia, entre los que se destaca la cápsula que la protege de la acción bactericida del suero y dificulta la fagocitosis (Brisse et al., 2009). Concomitantemente a estos factores de virulencia, *K. pneumoniae* ha adquirido múltiples mecanismos de resistencia, pero sin duda alguna la presencia de la carbapenemasa KPC (por sus siglas en inglés: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) representa el problema mas grande en nuestro país.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase **(KPC)**

KPC es una beta-lactamasa tipo carbapenemasa que tiene la capacidad de hidrolizar prácticamente todos los antibióticos beta-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, siendo una de las enzimas más prevalentes y uno de los principales problemas a nivel de resistencia en el mundo. Desde su descubrimiento en Estados Unidos (Yigit et al., 2001), estas carbapenemasas han sido detectadas en muchas especies de *Enterobacterales*, pero *K. pneumoniae* continúa siendo el microorganismo donde más reporta (Cuzon et al., 2010). Se clasifica dentro de la clase

A segun la nomenclatura de Ambler. Estas enzimas junto con las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), son las más comunes dentro de los *Enterobacterales*. Inicialmente fue reportada en Carolina del Norte en Estados Unidos, en un aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemicos dando origen a su nombre (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- KPC-1). Posteriormente por experimentos de electroporación reveló un plásmido de 50 kb como el portador del gen bla_{KPC} (Yigit et al., 2001).

Su descubrimiento fue seguido por el hallazgo de una variante que fue encontrada en cuatro aislados de *K. pneumoniae* en Maryland, Estados Unidos, con una mutación puntual en la posición 650 (Ser650Gly), denominada como KPC-2. Posteriormente se identificó que las secuencias de KPC-1 y 2 eran iguales http://www.bldb.eu/. A partir de ese momento, esta enzima comenzó a reportarse en otras bacterias del orden *Enterobacterales* en todo el mundo. Estudios realizados en *Salmonella* sp, reportaron que el gen bla_{KPC} estaba flanqueado por 4 ORF (acrónimo en inglés: Open Reading Frames) y los péptidos putativos fueron similares a las proteínas asociadas a elementos genéticos transponibles (transposasas), encontradas en los transposones de la familia *Tn3* (Bratu et al., 2005).

La diseminación inicial estuvo circunscrita a Estados Unidos hasta el 2005 cuando se hizo el primer reporte de esta enzima en Francia en un paciente con historia de viaje reciente a los Estados Unidos. Los estudios moleculares mostraron la presencia de KPC-2 en un plásmido conjugativo de 70 kpb. Los análisis del entorno genético del gen bla_{KPC-2} (2,8 kb aprox.) fueron congruentes con los resultados encontrados anteriormente (Poirel y Nordmann, 2002). El segundo reporte en el mundo de KPC-2 fuera de los Estados Unidos y de pacientes que no presentaron ningún antecedente de viaje a este país, se realizó en Colombia a partir de aislamientos clínicos

de *K. pneumoniae* en dos hospitales de la ciudad de Medellín (Villegas et al., 2006). A partir de ese momento comenzó a reportarse en otros países, existiendo a la fecha más de 46 variantes de esta enzima. (Naas et al., 2017).

En Colombia se reportó la presencia de KPC en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* por primera vez en el mundo (Villegas et al., 2006) y en el 2010 fue reportada en Puerto Rico por primera vez en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (Robledo et al., 2010).

La relación genética de los patógenos multidrogoresistentes (MDR) y el conocimiento de su distribución en la población, son dos factores esenciales para la comprensión de la epidemiología de las infecciones producidas por estos microorganismos, constituyendo una herramienta básica para el diseño de políticas de control de infecciones (Fey y Rupp, 2003). Para ello, se han desarrollado diferentes metodologías moleculares, entre ellas, la electroforesis de campos pulsados (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE), que ha sido considerada como la técnica estándar de tipificación por poseer un alto poder discriminatorio en patógenos que poseen altas tasas de mutación y recombinación, lo cual resulta conveniente en estudios de corto plazo o de brotes a nivel local. Sin embargo, esta herramienta no ha sido utilizada para estudios poblacionales de largo plazo y a nivel global por su baja reproducibilidad y comparabilidad entre laboratorios (Bae et al., 2014). Con estos antecedentes a nivel mundial, se vio la necesidad de implementar una metodología que permitiera el análisis poblacional a un nivel de jerarquía mayor como el MultiLocus Sequencing Typing (MLST), que combinando secuenciación a gran escala, bioinformática y técnicas para el estudio de genética de poblaciones como el eBURST y su versión mejorada el goeBURST, ha demostrado ser una herramienta valiosa para la identificación precisa y seguimiento de linajes MDR considerados como clones de alto riesgo (Mathers et al., 2015; Woodford et al., 2011).

K. pneumoniae portadora de la enzima KPC y su expansión global ha sido evidenciada por numerosos estudios, y la emergencia y rápida diseminación global asociada al clon de alto riesgo ST258 que ha sido reportado en Estados Unidos, Israel (Navon-Venezia et al., 2006), Noruega, Suecia (Samuelsen et al., 2009) Grecia (Karampatakis et al., 2016) y Colombia (Villegas et al., 2006) entre otros. Este ST junto con los ST11 y ST270 conforman el denominado complejo clonal 11 (CC11), que ha sido identificado en Corea como portador de otras beta-lactamasas como SHV-12, SHV-31, CTX-M 14, CTX-M 15 y CTX-M 22 (Ko et al., 2010). No obstante, a diferencia de lo que ocurre con *Escherichia coli* portador de CTX-M 15, múltiples ST diferentes al ST258 de *K. pneumoniae* portan esta enzima entre los cuales están los ST11, ST14, ST15, ST326, ST327 y ST321 (Cuzon et al., 2010).

Por otra parte, otra característica importante a tener en cuenta en la diseminación de esta enzima es la presencia de elementos genéticos relacionados con la movilización y su fácil diseminación. En el año 2008 se confirmó la presencia de un transposón tipo *Tn3*, denominado *Tn*4401 asociado al gen bla_{KPC}, el cual presenta una alta variabilidad especialmente en la región intergénica entre el gen bla_{KPC} y la secuencia de inserción denominada IS*Kpn7* en la cual se observan deleciones lo que ha permitido identificar más de siete variantes o isoformas, lo cual indica la amplia diversidad del entorno genético que rodea al gen y que puede llevar a diferencias marcadas en su transmisibilidad (Naas et al., 2008; Shen et al., 2009).

En Colombia, *K. pneumoniae* se ubica dentro de las cinco bacterias más aisladas a nivel hospitalario (Hernández-Gómez et al., 2013). La presencia de KPC-2 en *K. pneumoniae* fue reportada por primera vez en el pais el año 2006 (Villegas et al., 2006), adicionalmente se reportó la diseminación intercontinental desde Israel a Colombia de una cepa productora de KPC-

3 (Navon-Venezia et al., 2006), así como la caracterización del entorno genético de bla_{KPC} en el transposón *Tn*4401 portador de bla_{KPC-2} (Naas et al., 2008). Finalmente, en el año 2009 se encontraron diferentes ST asociados con la diseminación de KPC-2 y KPC-3 en *K. pneumoniae*, en donde los ST258 y ST512 fueron los ST predominantes (Mojica et al., 2012). Sin embargo, el análisis fue realizado solamente con aislados recuperados durante el 2009 con un número limitado de aislamientos, por lo que se vio la necesidad de ampliar el estudio e identificar un panorama más completo.

Después de la diseminación de esta carbapenemasa asociada a determinados linajes a nivel mundial, en Colombia se comenzó a reportar la presencia de estos linajes de manera aislada (Mojica et al., 2012). Sin embargo, el desconocimiento en el tiempo sobre la diseminación de los clones de alto riesgo en el pais era evidente. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de clones de alto riesgo y su contexto genético en términos de beta-lactamasas en una población de *K. pneumoniae* MDR en Colombia, con el fin de establecer los patrones de diseminación.

2. Metodología

Aislamientos bacterianos

Se realizó un estudio observacional descriptivo. Los aislamientos involucrados en este estudio pertenecen al biobanco del Grupo de Resistencia Bacteriana e Infecciones Asociadas a la Atención en Salud del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) provenientes de pacientes de la Red de hospitales del mismo, recolectados desde el 2008 al 2010 a través de los diferentes proyectos

realizados. El tamaño de la muestra fue seleccionado por conveniencia teniendo en cuenta la disponibilidad de los aislados. Un total de 124 aislados de *K. pneumoniae* previamente caracterizadas como portadoras del gen bla_{KPC} fueron seleccionadas. Posteriormente, una vez descongelado el aislamiento se confirmo la presencia del gen bla_{KPC} mediante qPCR con sondas *TaqMan* (Tabla 6). A los aislados confirmados se les realizó el proceso de genotipificación.

Tabla 6. Cebadores y sondas diseñadas para la detección de genes bla por qPCR

Gen blanco	Cebador / sonda	Secuencia 5´ - 3´	Fluoroforo
bla_{KPC}	**blaKPC_CONSENSUS_F**	GGACACACCCATCCGTTA	**FAM**
	blaKPC_CONSENSUS_R	GCGGCGTTATCACTGTATTG	
	blaKPC_CONSENSUS_Probe	TCCGCCACCGTCATGCCTGTTG	
bla_{VIM}	**VIM CONSENSUS_F**	GCTTCGGTCCAGTAGAACTC	**CalRed 610**
	VIM CONSENSUS_R	AGACGTGCGTGACAACTC	
	VIM CONSENSUS_Probe	AATCGCACAACCACCATAGAGCA-CACT	
bla_{IMP}	**blaIMP_CONSENSUS_F**	GCGGCTATAAAATAAAAGGCAGTA	**Quasar 705**
	blaIMP_CONSENSUS_R	GATGCATACGTGGGGATAGA	
	blaIMP_CONSENSUS_Probe	CACATTTCCATAGCGACAGCAC-GGGC	
bla_{NDM}	**qNDM-F**	CAACGGTTTGGCGATCTG	**CalGold 540**
	qNDM-R	DGCCATCCCTGACGATCAA	
	NDM_CONCENSUS_Probe	CGCACCGAATGTCTGGCAGCACA	

bla_{CTX-M}	**qCTX-M F**	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	**CalRed 610**
	qCTX-M R	ATCACKCGGRTCGCCXGGRAT	
	CTX-MGrupo1_Probe	CCCGACAGCTGGGAGACGAAACGT	
bla_{TEM}	**blaTEM_CONSENSUS_F**	TGGCATGACAGTAAGAGAATTATG	**CalGold 540**
	blaTEM_CONSENSUS_R	CAAGGCGAGTTACATGATCC	
	blaTEM_CONSENSUS_Probe	AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCC	
bla_{SHV}	**blaSHV_CONSENSUS_F**	CAGGATCTGGTGGACTACTC	**Quasar 670**
	blaSHV_CONSENSUS_R	CGCTGTTATCGCTCATGG	
	blaSHV_CONSENSUS_Probe	CGCAGAGTTCGCCGACCGTCA	

Fuente: Elaboración propia.

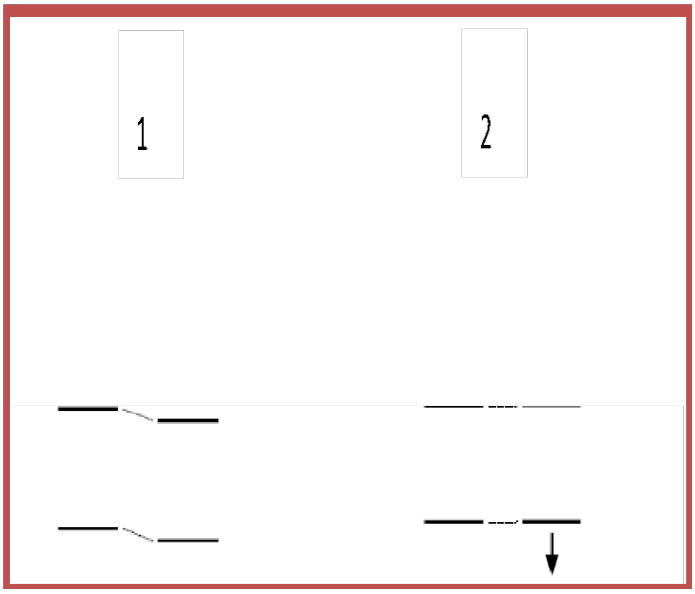
Genotipificación por Electroforesis de Campos Pulsados (*Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE*)

Se realizó la prueba utilizando el protocolo publicado anteriormente (Gautom,1997) con algunas modificaciones. Brevemente,a partir de cultivo bacteriano puro se preparó una suspensión en buffer CSB (100mM Tris, EDTA 100mM). Aparte se preparó agarosa al 1,6% en buffer TE (10mM Tris, 0,1 mM EDTA) y se conservó a 56°C hasta su utilización. Una mezcla con 200 ul de la suspensión bacteriana y 200 µl de la agarosa Sea Kem Gold (lonza group,U.S.A) al 1,6%,fue utilizada para la preparación de los moldes (Bio-Rad, Laboratories, CA. U.S.A). Para el proceso de lisis bacteriana, los moldes fueron colocados en buffer de lisis (50mM Tris; EDTA 50mM,pH 8.0; 1% N-laurilsarcosina; 1 mg/ml proteinasa K) y lavados con agua destilada estéril y buffer TE a 50°C. Los moldes se almacenaron en buffer TE hasta su utilización. Para la restricción enzimática, se utilizaron 2 mm de cada

molde y se adicionó la enzima de restricción *Xba*I (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, se preparó un gel de agarosa LE (Lonza Group, U.S.A) al 1%, cada molde se colocó con la ayuda de una laminilla y un asa en los pozos del gel y posteriormente fueron sellados con agarosa al 1%. El gel fue corrido en la cámara de PFGE por 22 horas a 14ºC a 6 v/cm con unos tiempos de intercambio inicial de 2.16 s y final de 63.8 s. La visualización del DNA genómico fue realizada mediante tinción del gel utilizando bromuro de etidio (0,3 µg/ml) por 1 hora. El análisis fue realizado utilizando el software Fingerprinting II que permitió: i) Documentar los geles, generando patrones electroforéticos comparables. ii) Normalización de los patrones iii) Generación de una base de datos iv) Comparación e identificación de patrones por similitud. (https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4000076-03A.pdf). Los criterios de análisis utilizados fueron:

Agrupamiento: El método más común de agrupamiento utilizado en bacterias y deducción de dendograma es UPGMA por sus siglas *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean* (Tsakris et al., 2003). Esta herramienta bioinformática permite agrupar de manera jerárquica una población analizada y crear árboles genéticos.

Similitud: Aunque existen varios métodos de comparación para este tipo de análisis (Correlación de Pearson, Coeficiente de Jaccard), el Coeficiente de Dice es el más utilizado en bacterias. El software permite hacer ajustes para la comparación entre diferentes geles, denominado normalización incluye unos porcentajes de tolerancia y optimización; comparando diferentes corridas electroforéticas (Figura 6).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 6. Ajustes realizados para la comparación entre geles de PFGE: (1) Tolerancia: cambio mínimo permitido entre dos bandas para considerarlas comparables. (2) Optimización: cambio permitido entre dos patrones para considerarlos comparables. Ambos criterios deben ser tenidos en cuenta para la normalización en el análisis de PFGE usando fingerprinting software (https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4000076-03A.pdf).

El Coeficiente de Dice define la similitud en términos de porcentaje; se considera entonces qué porcentajes de similitud por encima del 75% sugieren la presencia de un ancestro común, generando grupos clonales.

100%: Idénticos
99 - 85%: Relacionados
86 - 75%. Posiblemente relacionados
Menor del 75%. No relacionados.

Genotipificación por Multilocus Sequence Typing

El esquema para realizar el MLST de *K. pneumoniae c*ontempla los genes *rpoB* (subunidad B de la ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucosa isomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción 2), *tonB* (transductor de energía periplasmática) (http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html): Los cebadores utilizados tanto para la reacción de amplificación, como la reacción de secuenciación se presentan a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores y condiciones de amplificación para realizar el MLST de *K. pneumoniae*

Locus	Primera amplificacion y secuencia	Uso
rpoB	**F: Vic3:** GGCGAAATGGCWGAGAACCA	amp/seq
	R: Vic2: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	amp/seq
gapA	**F:gapA173:** TGAAATATGACTCCACTCACGG	amp/seq
	R:gapA181: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	amp/seq
mdh	**F:mdh130:** CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG	amp/seq
	R:mdh867: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	amp/seq
pgi	**F:pgi1F:** GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	amp
	R:pgi1R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	amp
	pgi2F: CTGCTGGCGCTGATCGGCAT	seq
	pgi2R: TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	seq
phoE	**F:phoE604.1:** ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	amp/seq
	R:phoE604.2: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	amp/seq

infB	**F:infB1F:** CTCGCTGCTGGACTATATTCG	amp
	R:infB1R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	amp
	infB2F: ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC ia	seq
tonB	**F:tonB1F:** CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	amp/seq
	R:tonB2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	amp/seq

Abreviaturas. Amp: amplificación; Seq: secuenciación.

Condiciones de amplificación		
Temp.	**Tiempo**	
94°C	2 min	
94°C	20 seg	╗
55°C	30 seg	35 ciclos
72°C	30 seg	╝
72°C	5 min	
10°C	α	

Fuente: Elaboración propia.

En todos los casos, tras la amplificación de los genes correspondientes, los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis en un gel de agarosa LE (Lonza Group) al 1% y al finalizar la electroforesis los productos de PCR fueron escindidos del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a Macrogen para su posterior secuenciación. Posteriormente los resultados de la secuenciación fueron inicialmente

analizados en el software *Codón Code Aligner* (Phred algorithm) para identificar la pureza de las secuencias y posteriormente llevadas para la asignación de alelos y ST a la base de datos (http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html). Para el análisis de la información derivada del MLST y su relación filogenética con los ST reportados a nivel local y mundial, se utilizó goeBURST usando el software PHILOViZ.

Análisis PCR para los genes *bla* acompañantes

Una reacción multiplex por qPCR con sondas *TaqMan* fue utilizada para confirmar la presencia de los genes bla_{OXA}, bla_{VIM}, bla_{CTX-M}, bla_{IMP}, bla_{TEM}, y $bla_{SHV.}$ Las sondas y cebadores fueron diseñados usando el software Beacon Designer 8.0 (Premier Biosoft International) (Tabla 6). El ADN total fue utilizado como plantilla para la reacción, las concentraciones finales de cebadores y sondas en la reacción fueron de 0,2 µM cada uno. Volumen adicional de magnesio (1µl [25mM]) y dNTPs (1.5 µl [10mM]) fueron agregados por reacción. Para la reacción de PCR se utilizó el sistema CFX96 (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA). Las condiciones para el multiplex qPCR fueron: 50°C por 2min, 95°C por 2 min, seguidos por 40 ciclos a 95°C (15s) y 60°C (1min). Las muestras con un valor de C_T menor de 35 fueron consideradas positivas.

Una vez identificadas las beta-lactamasas, se determinaron las variantes de las enzimas codificadas en los genes *bla* previamente detectados. Para ello, tras la amplificación de los genes correspondientes, los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis en un gel de agarosa LE (Lonza Group, USA) al 1% y al finalizar la electroforesis los productos de PCR fueron escindidos del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a Macrogen para su posterior secuenciación.

Caracterización del entorno genético de los genes *bla*$_{KPC}$

Para la caracterización del entorno genético de los genes *bla*$_{KPC}$, se realizó la identificación del *Tn*4401 utilizando los cebadores previamente publicados (Tabla 8). Al finalizar el procedimiento de amplificación, los fragmentos fueron cortados del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a un laboratorio externo para su secuenciación. Los resultados de la secuenciación fueron inicialmente analizados en el software *Codón Code Aligner* (Phred algorithm) para identificar la pureza de las secuencias y las variantes de beta-lactamasas fueron identificadas mediante comparación de las secuencias obtenidas con aquellas disponibles en GenBank utilizando la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tabla 8. Cebadores y sondas utilizados para la detección del entorno genético de *bla*$_{KPC}$

Nombre	Secuencia	Referencia
KpcA	5'-CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC-3'	
KpcB	5'-CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC-3'	
4281	5'-GGC ACG GCA AAT GAC TA-3'	
4714	5'-GAA GAT GCC AAG GTC AAT GC-3'	
SeqRIout	5'-ACG ACC ACG CAC GCA CAA AC-3'	
3'EndYC	5'-GCA TCA AAC GGA AGC AAA AG-3'	
3781L	5'-GCT TTC TTG CTG CCG CTG TG-3'	(Naas et al., 2008)
3098U	5'-TGA CCC TGA GCG GCG AAA G-3'	
905L	5'-GCG ACC GGT CAG TTC CTT CT-3'	
816U	5'-CAC CTA CAC CAC GAC GAA CC-3'	
141R-6	5'-TCA CCG GCC CTC ACC TTT GG-3'	
5'endYC	5'-CTT AGC AAA TGT GGT GAA CG-3'	
KPC R	5' - CTCAGTGCTCTACAGAAAACC - 3'	

istB5'R	5'-CTGACCCACTTTACCCCTGA-3'	Este estudio
tnpAKPCF	5'-CGTGTTTCATGATCCGGCTG-3'	Este estudio
tnpAKPCR	5'-TTCATCCGGCGATGATGGTC-3'	Este estudio

Fuente: Elaboración propia.

Caracterización de plásmidos portadores de los genes *bla*

PFGE-S1: Para la caracterización de los plásmidos portadores de genes *bla* en cuanto a tamaño se utilizó PFGE-S1 según la metodología descrita previamente en PFGE, con algunas modificaciones (Barton et al., 1995) Brevemente, se realizó el mismo procedimiento presentado previamente para la preparación de los moldes de PFGE, igualmente, se tomaron 2 mm del molde y fueron sometidos a digestión con una unidad de nucleasa S1 (Takara) en 200 µL de buffer de S1 y finalmente incubados a 55°C por 45 min. La electroforesis se realizó utilizando las siguientes condiciones de corrida: 6 V, 1seg-30seg por 20 horas. Los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). La marcación de sondas y la detección se realizó utilizando el estuche comercial *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

PFGE-*Ceu*-I: La localización de los genes *bla* (cromosomal o plasmídica) se confirmó por ensayos de hibridación con sondas específicas para los genes 23S ARNr y *bla* según el protocolo reportado previamente y descrito en PFGE. Rápidamente, el DNA embebido en agarosa se incubará a 37°C durante la noche con una unidad de endonucleasa *I-Ceu*-I en 200 µl de buffer. Al igual que para PFGE-S1 la electroforesis se realizó utilizando las siguientes condiciones de corrida: 6 V, 1seg-30seg por 20 horas. Los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana

de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). La marcación de sondas y la detección se realizó utilizando el estuche comercial *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

***PCR-replicon typing* – PRT:** Para la caracterización de los plásmidos asociados a la diseminación de las carbapenemasas, a partir de colonia pura se realizó el proceso de extracción de DNA total utilizando el estuche comercial *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit*. La identificación de los plásmidos asociados a la presencia de los genes *bla* en *K. pneumoniae*, se realizó utilizando el sistema de tipificación de plásmidos. Los cebadores utilizados y sus condiciones se presentan en la Tabla 9 (Carattoli et al., 2005).

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados para la detección de *PCR-replicon typing* – PRT

Nombre	Secuencia del cebador	Sitio blanco
HI1 FW	5′-ggagcgatggattacttcagtac-3′	**parA-parB**
HI1 RV	5′-tgccgtttcacctcgtgagta-3′	
HI2 FW	5′-tttctcctgagtcacctgttaacac-3′	**iterons**
HI2 RV	5′-ggctcactaccgttgtcatcct-3′	
I1 FW	5′-cgaaagccggacggcagaa-3′	**RNAI**
I1 RV	5′-tcgtcgttccgccaagttcgt-3′	
X FW	5′-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3′	**ori γ**
X RV	5′-tgagagtcaatttttatctcatgttttagc-3′	

L/M FW	5′-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3′	**repA, B, C**
L/M RV	5′-ctgcaggggcgattctttagg-3′	
N FW	5′-gtctaacgagcttaccgaag-3′	**repA**
N RV	5′-gtttcaactctgccaagttc-3′	
FIA FW	5′-ccatgctggttctagagaaggtg-3′	**iterons**
FIA RV	5′-gtatatccttactggcttccgcag-3′	
FIB FW	5′-ggagttctgacacacgattttctg-3′	**repA**
FIB RV	5′-ctcccgtcgcttcagggcatt-3′	
W FW	5′-cctaagaacaacaaagcccccg-3′	**repA**
W RV	5′-ggtgcgcggcatagaaccgt-3′	
Y FW	5′-aattcaaacaacactgtgcagcctg-3′	**repA**
Y RV	5′-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3′	
P FW	5′-ctatggccctgcaaacgcgccagaaa-3′	**iterons**
P RV	5′-tcacgcgccagggcgcagcc-3′	
FIC FW	5′-gtgaactggcagatgaggaagg-3′	**repA2**
FIC RV	5′-ttctcctcgtcgccaaactagat-3′	
A/C FW	5′-gagaaccaaagacaaagacctgga-3′	**repA**
A/C RV	5′-acgacaaacctgaattgcctcctt-3′	
T FW	5′-ttggcctgtttgtgcctaaaccat-3′	**repA**
T RV	5′-cgttgattacacttagctttggac-3′	

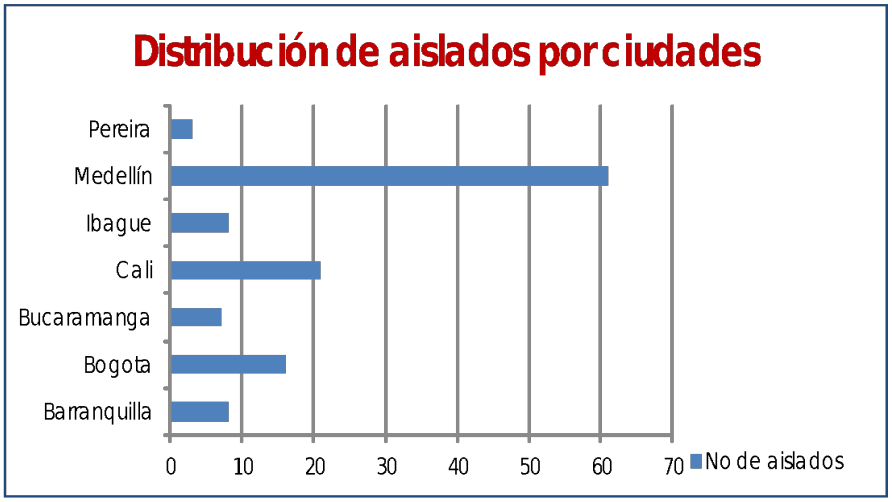
FII_S FW	5′-ctgtcgtaagctgatggc-3′	**repA**
FII_S RV	5′-ctctgccacaaacttcagc-3′	
F_{repB} FW	5′-tgatcgtttaaggaattttg-3′	**RNAI/repA**
F_{repB} RV	5′-gaagatcagtcacaccatcc-3′	
K/B FW	5′-gcggtccggaaagccagaaaac-3′	**RNAI**
K RV	5′-tctttcacgagcccgccaaa-3′	
B/O RV	5′-tctgcgttccgccaagttcga-3′	**RNAI**

Fuente: Elaboración propia.

3. Resultados y discusión

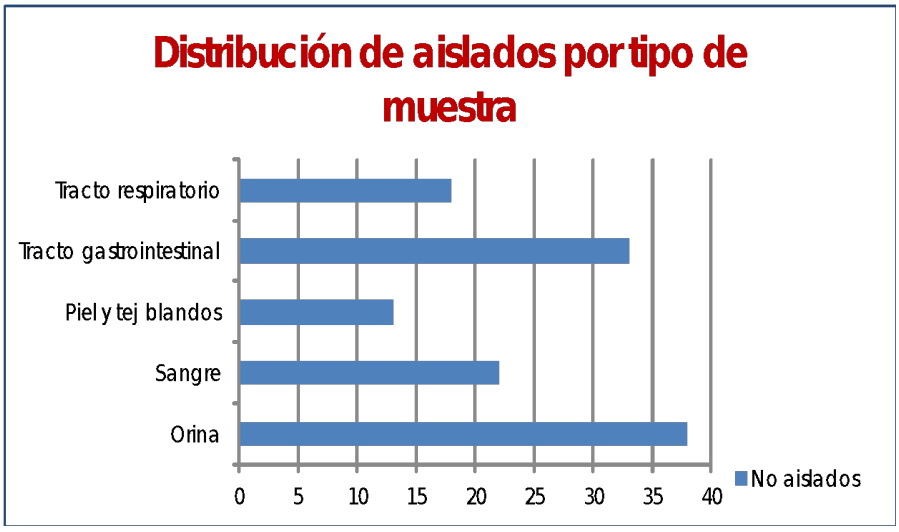
Los 124 aislados seleccionados (uno por paciente) fueron recolectados de siete ciudades y once hospitales de tercer nivel entre el 2008 y 2010 (Figura 7). La mayoría de los aislados pertenecían a la ciudad de Medellín, seguidos por Cali y Bogotá. La mayoría de los aislados provenían de pacientes de las unidades de cuidado intensivo (UCI) y las muestras más frecuentes fueron orina (n=42), sangre (n=22) y tracto gastrointestinal (n=36) (Figura 8).

Figura 7. Distribución de aislados de *K. pneumoniae* MDR por ciudades



Fuente: Elaboración propia.

Figura 8. Distribución de aislados de *Klebsiella pneumoniae* MDR por tipo de muestra



Fuente: Elaboración propia.

El resultado de la qPCR confirmó la presencia del gen bla_{KPC} en los 124 aislamientos analizados. Todos los aislados portadores de la carbapenemasa tipo KPC mostraron siete diferentes pulsotipos (PTG) al realizar el análisis por PFGE. Dentro de los PTG encontrados, el PTG5 contiene 85 de los aislados analizados (similitud menor de 75%) pertenecientes a 6/7 ciudades incluidas en el estudio, indicando que estos aislamientos están asociados a una diseminación de tipo clonal en el país. De cada pulsotipo se seleccionó al menos un aislamiento para el análisis de MLST (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de PFGE de *K. pneumoniae*

Pulsotipo	No. De aislados	No. De hospitales	CIUDAD
PTG1	7	2	BOG/MED
PTG2	23	1	MED
PTG3	4	1	MED
PTG4	3	1	BQA
PTG5	85	10	CLO/BOG/IBE/MED/BGA/PEI
PTG6	1	1	MED
PTG7	1	1	CLO

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: BOG: Bogotá, MED: Medellín, BQA: Barranquilla, IBE: Ibague, CLO: Cali, BGA: Bucaramanga, PEI: Pereira.

Para llevar a acabo el análisis de las variantes de la carbapenemasa tipo KPC junto con el estudio de su entorno genético y la presencia de beta-lactamasas acompañantes, se seleccionó al menos un aislamiento por pulsotipo. Las variantes de la carbapenemasas tipo KPC identificadas

fueron KPC-2 y KPC-3. En cuanto al entorno genético del gen $bla_{KPC,}$ se observó la presencia del Tn*4401* tanto en la isoforma a como en la b. Cabe anotar que el PTG5 estuvo asociado al gen bla_{KPC-3} en ambas isoformas, mostrando una gran variabilidad (Tabla 11). Similares resultados fueron reportados posteriormente por Rojas et al., al utilizar secuenciación del genoma completo (Rojas et al., 2018).

En cuanto a las beta-lactamasas acompañantes de la enzima KPC, se encontraron enzimas tipo penicilinasa TEM-1 y SHV-1, adicionalmente se encontraron beta-lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M 12 y 15 y SHV -2, 5, 11, 12, 28 (Tabla 11).

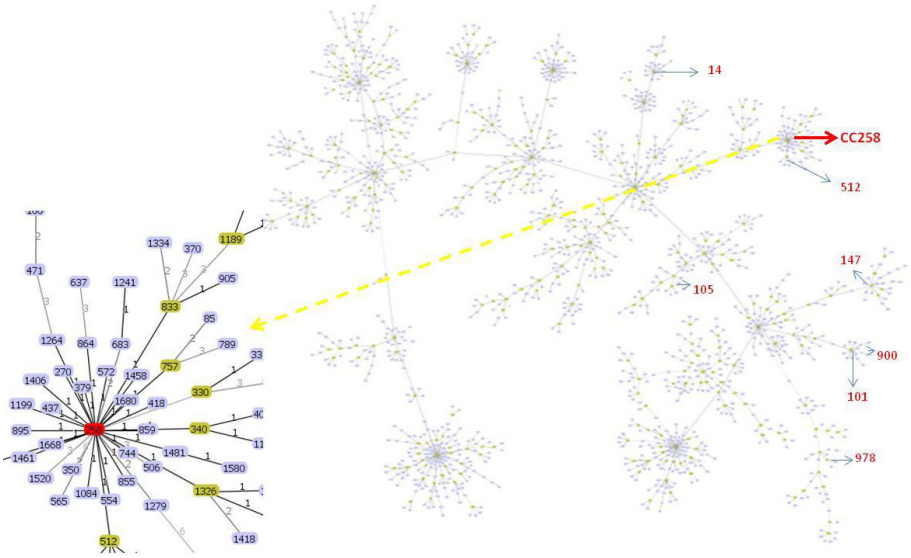
Tabla 11. Tipificación de aislamientos de *K. pneumoniae* MDR seleccionados para análisis de MLST

ID CIDEIM	HOS	Pulsotipo	No aislados	Ciudad	ST	*bla* KPC	Isoforma Tn*4401*	Enzimas acompañantes	FOT	AXO	P/4	FEP	TAZ	AZT	IMI	ETP	CIP	AMI	TGC	POL
1776	CGN	PTG1	7	BOG/MED	147	KPC-2	b	CTX-M 15, SHV-1, TEM-1	>32	>64	>128	16	32	>32	≤0.12	1	>8	64	0.5	1
1619	CGN	PTG1		MED	147	KPC-2	b	CTX-M 15, SHV-2	>64	>64	128	32	32	>32	≤0.5	≤0.5	>8	32	0.5	≤0.5
2035	HPTU	PTG2	23	MED	14	KPC-2	b	TEM-1	>32	64	128	32	>32	>16	>64	>32	2	32	0.5	≤0.5
1542	HPTU	PTG2		MED	14	KPC-2	b	SHV-12	8	≤8	256	2	128	>32	2	2	≤1	16	0.5	≤0.5
772	HPTU	PTG3	4	MED	101	KPC-2	b	SHV-1	16	32	256	8	16	>32	4	4	≤1	≤8	0.5	2
1327	CGN	PTG4	3	BQA	258	KPC-2	b	SHV-28, TEM-1	≤2	32	128	≤0.5	≤2	≤8	≤0.5	4	≤1	32	0.5	≤0.5
869	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11, TEM-1	64	>64	>256	128	128	>32	32	128	>8	32	1	2
1091	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11	64	>64	>256	128	256	>32	>128	128	>8	32	0.5	≤0.5
574	HMC	PTG5	85	CLO/BOG//IBE/ MED/BGA/PEI	258	KPC-3	b	CTX-M 12	32	64	256	16	256	>32	4	8	>8	>64	0.5	1
2267	CFVL	PTG5			258	KPC-3	b	SHV-12, TEM-1	>32	>64	>128	32	>32	>32	32	>32	>8	32	1	≤0.5
878	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11	>64	>64	>256	128	256	>32	64	64	>8	32	0.5	2
789	HFLLA	PTG5			258	KPC-3	a	SHV-12	32	64	>256	8	>256	>32	1	2	>8	32	0.5	2
2039	HPTU	PTG6	1	MED	979	KPC-2	b	SHV-5	16	16	64	2	32	>16	2	4	≤0.5	≤8	0.5	≤0.5
1994	CFVL	PTG7	1	CLO	978	KPC-2	b	SHV-11	8	16	32	8	4	16	64	>32	4	16	4	≤0.5

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: PTG: Pulsotipo grupo, BOG: Bogotá, PEI: Pereira, MED: Medellín, CLO: Cali, BGA: Bucaramanga, BQA: Barranquilla, IBE: Ibagué, IMI: imipenem, MER: meropenem, AK: Amikacina, AZT: aztreonam, CEP: Cefepime, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, PIP/TAZ: piperacilina/tazobactam, POLB: polimixina.

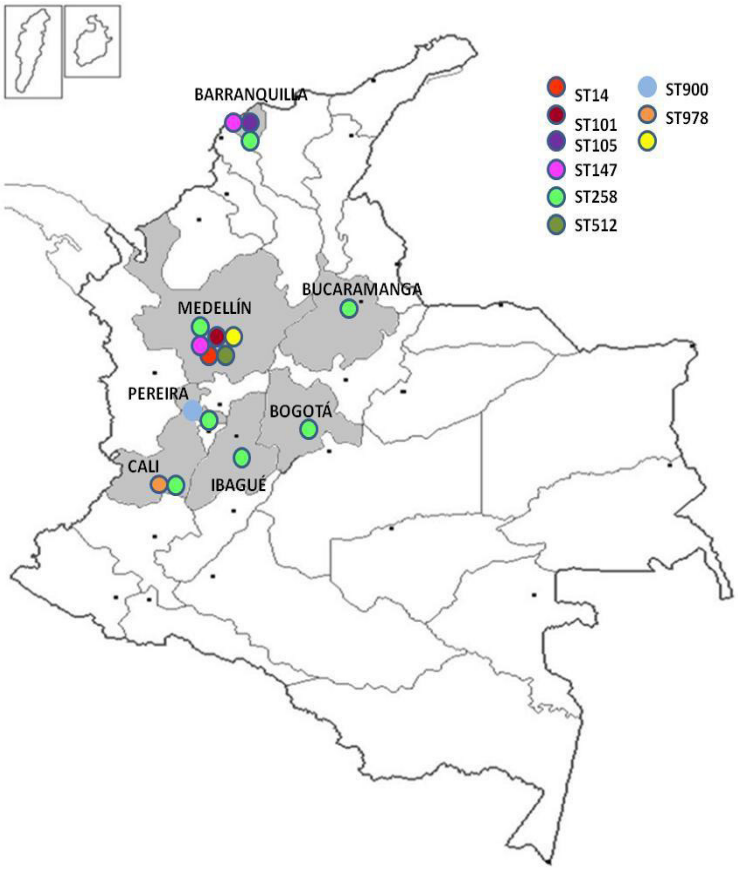
Adicionalmente, los aislados seleccionados para la identificación y secuenciación de beta-lactamasas, fueron utilizados para el análisis de MLST. Los resultados mostraron 8 STs diferentes: ST147, ST512, ST17, ST14, ST101, ST978, ST979 y ST258 (Figura 9).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 9. Distribución de los diferentes ST encontrados en *K. pneumoniae* en Colombia. Utilizando goeBURST (PHILOViZ). Se observa una gran variabilidad de STs. La línea amarilla muestra una ampliación del *High risk clone* CC258.

Es importante resaltar la distribución del PTG5 en seis de las siete ciudades del país evaluadas, que, además, es el que contiene el mayor número de aislados. El 66% de ellos eran portadores del gen bla_{KPC-3} y estaban asociados a los ST258 y ST512, ambos pertenecientes al mismo complejo clonal (Figura 10); sin embargo, en las siete ciudades se encontró la presencia del GC258.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 10. Diseminación de clones de alto riesgo de *Klebsiella pneumoniae* MDR en Colombia. Se observa la distribución del GC258 (ST258 y ST512) en las 7 ciudades estudiadas.

El GC258 ha sido reconocido a nivel mundial como el principal linaje asociado a la diseminación de KPC (Mathers et al., 2015b; Woodford et al., 2011); sin embargo recientes hallazgos utilizando secuenciación del genoma han confirmado como este ST258 está formado por dos diferentes clados dentro del mismo ST, indicando que estudios adicionales son requeridos para llegar a un mejor entendimiento de esta población (Szijártó et al., 2016). Los demás STs encontrados eran portadores del gen $bla_{KPC-2;}$ y la mayoría de ellos provenían de Medellín, ciudad en la cual fue reportada por primera vez en Colombia esta carbapenemasa. Estos resultados fueron posteriormente confirmados con los análisis realizados por secuenciación del genoma completo incluyendo parte de estos aislados y adicionando aislados de los años 2002 hasta el 2014 mostrando como la diseminación del gen bla_{KPC-2} no solo mostró mayor diversidad de STs; sino que ha sido desplazada por el gen bla_{KPC-3} asociado al GC258 (Ocampo et al., 2016; Rojas et al., 2018).

En cuanto al análisis plasmídico (PRT) se detectó la presencia de los plásmidos tipo Inc B/O, FIC, A/C, PIA, T, W, K/B, FIA, L/M, N, I1 entre los aislados analizados, mostrando una gran variabilidad. En otros estudios se ha mostrado que los plásmidos portadores de bla_{KPC} más comunes son los que pertenecen al complejo de incompatibilidad IncFIIA, IncN e IncA/C, lo cual podría explicar la alta capacidad de diseminación de estas enzimas en Colombia. En un estudio posterior realizado por Rojas y col., confirmaron estos resultados identificando dos formatos de diseminación de *K. pneumoniae* portadora de KPC; una diseminación clonal de KPC-3 asociado al GC258 y una plasmídica de KPC-2 (Rojas et al., 2018).

Aunque *K. pneumoniae* portadora de KPC fue reportada en Colombia por primera vez en el año 2005, en la ciudad de Medellín; desde entoces su expansión a otras enterobacterias y a *Pseudomonas* spp., ha sido exponencial (Correa et al., 2012; Mojica et al., 2012). Inicialmente *K.*

pneumoniae fue encontrada como portadora del gen $bla_{KPC-2;}$ pero en el 2008 se identificó el supuesto ingreso de bla_{KPC-3} al país asociado a un brote presentado en la ciudad de Medellín en el cual el caso índice fue atribuido a un paciente cuya procedencia era Israel donde ya se había reportado esta variante (Lopez et al., 2011). Sin embargo, estudios posteriores identificaron que KPC-3 estaba circulando en el país desde el año 2007 (Rojas et al., 2018).

Anteriormente en Colombia se habían descrito diferentes STs asociados a la diseminación del gen bla_{KPC} con diferentes contextos genéticos, sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación y la investigación subsiguiente, permiten concluir que la introducción del ST258 generó una expansión clonal para el gen bla_{KPC-3} que comenzó a desplazar el gen $bla_{KPC-2,}$ el cual se asocia más a una alta diseminación plasmidica (Rojas et al., 2018).

4. Agradecimiento

A la líder científica del Grupo de Resistencia Bacteriana perteneciente al Centro Internacional De Entrenamiento e Investigaciones Médicas en donde fue desarrollado este trabajo. Este trabajo fue financiado por Colciencias, Merck S.A y Pfizer.

Bibliografía

Alós, J.-I. (2015). [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, *33*(10), 692-699. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004

Bae, I. K.; Kim, J.; Sun, J. Y. H.; Jeong, S. H.; Kim, Y.-R.; Wang, K.-K. & Lee, K. (2014). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. *The Indian Journal of Medical Research*, *140*(5), 679-685.

Barton, B. M.; Harding, G. P. y Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*, *226*(2), 235-240. https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220

Bratu, S.; Landman, D.; Alam, M.; Tolentino, E. y Quale, J. (2005). Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 776-778. https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.776-778.2005

Brisse, S.; Fevre, C.; Passet, V.; Issenhuth-Jeanjean, S.; Tournebize, R.; Diancourt, L. & Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS One*, *4*(3), e4982. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982

Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K. L. & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, *63*(3), 219-228. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018

Correa, A.; Montealegre, M. C.; Mojica, M. F.; Maya, J. J.; Rojas, L. J.; De La Cadena, E.P.; Ruiz, S. J.; Recalde, M.; Rosso, F.; Quinn, J. P. & Villegas, M. V. (2012). First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(10), 5422-5423. https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12

Cuzon, G.; Naas, T.; Truong, H.; Villegas, M. V., Wisell, K. T.; Carmeli, Y.; Gales, A. C.; Venezia, S. N.; Quinn, J. P. & Nordmann, P. (2010). Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(9), 1349-1356. https://doi.org/10.3201/eid1609.091389

Fey, P. D. y Rupp, M. E. (2003). Molecular epidemiology in the public health and hospital environments. *Clinics in Laboratory Medicine*, *23*(4), 885-901. https://doi.org/10.1016/s0272-2712(03)00100-8

Gautom, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(11), 2977-2980.

Karampatakis, T.; Antachopoulos, C.; Iosifidis, E.; Tsakris, A. & Roilides, E. (2016). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiology*, *11*, 809-823. https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0042

Ko, K. S.; Lee, J.-Y.; Baek, J. Y.; Suh, J.-Y.; Lee, M. Y.; Choi, J. Y.; Yeom, J.-S.; Kim, Y.-S.; Jung, S.-I.; Shin, S. Y.; Heo, S. T.; Kwon, K. T.; Son, J. S.; Kim, S.-W.; Chang, H.-H.; Ki, H. K.; Chung, D. R.; Peck, K. R. & Song, J.-H. (2010). Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(Pt 7), 822-828. https://doi.org/10.1099/jmm.0.018119-0

Lopez, J. A.;Correa, A.; Navon-Venezia, S.; Correa, A. L.; Torres, J. A.; Briceño, D. F.; Montealegre, M. C.; Quinn, J. P.; Carmeli, Y. & Villegas, M. V. (2011). Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *17*(1), 52-56. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x

Mathers, A. J.; Peirano, G. y Pitout, J. D. D. (2015). *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, *90*, 109-154. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.002

Mojica, M. F.; Correa, A.; Vargas, D. A.; Maya, J. J.; Montealegre, M. C.; Rojas, L. J.; Ruiz, S. J.; Quinn, J. P.; Villegas, M. V. & Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. (2012). Molecular correlates of the spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *40*(3), 277-279. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006

Morehead, M. S. y Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care*, *45*(3), 467-484. https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.006

Naas, T.; Cuzon, G.; Villegas, M.-V.; Lartigue, M.-F.; Quinn, J. P. & Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(4), 1257-1263. https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07

Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P. & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) –

structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *32*(1), 917-919. https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235

Navon-Venezia, S.; Chmelnitsky, I.; Leavitt, A.; Schwaber, M. J.; Schwartz, D. & Carmeli, Y. (2006). Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 3098-3101. https://doi.org/10.1128/AAC.00438-06

Ovalle, M. V.; Saavedra, S. Y.; González, M. N.; Hidalgo, A. M.; Duarte, C. & Beltrán, M. (2017). Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, *37*(4), 473. https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3432

Podschun, R. y Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp*. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589-603.

Poirel, L. y Nordmann, P. (2002). Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *3*(2), 117-127. https://doi.org/10.2174/1389201023378427

Robledo, I. E.; Aquino, E. E.; Santé, M. I.; Santana, J. L.; Otero, D. M.; León, C. F. y Vázquez, G. J. (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter spp*. In Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 1354-1357. https://doi.org/10.1128/AAC.00899-09

Rojas, L. J.; Weinstock, G. M.; De La Cadena, E.; Diaz, L.; Rios, R.;Hanson, B. M.; Brown, J. S.; Vats, P.; Phillips, D. S.; Nguyen, H.; Hujer, K. M.;Correa, A.; Adams, M. D.; Perez, F.; Sodergren, E.; Narechania, A.;Planet, P. J.;

Villegas, M. V.; Bonomo, R. A. & Arias, C. A. (2018). An Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the "Perfect Storm". *The Journal of Infectious Diseases*, *217*(1), 82-92. https://doi.org/10.1093/infdis/jix524

Samuelsen, Ø.; Naseer, U.; Tofteland, S.; Skutlaberg, D. H.; Onken, A.; Hjetland, R.; Sundsfjord, A. & Giske, C. G. (2009). Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(4), 654-658. https://doi.org/10.1093/jac/dkp018

Shen, P.; Wei, Z.; Jiang, Y.; Du, X.; Ji, S.; Yu, Y.,& Li, L. (2009). Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(10), 4333-4338. https://doi.org/10.1128/AAC.00260-09

Solomon, S. L. y Oliver, K. B. (2014). Antibiotic resistance threats in the United States: Stepping back from the brink. *American Family Physician*, *89*(12), 938-941.

Szijártó, V.; Guachalla, L. M.; Hartl, K.; Varga, C.; Banerjee, P.; Stojkovic, K.; Kaszowska, M.; Nagy, E.; Lukasiewicz, J. & Nagy, G. (2016). Both clades of the epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST258 share a modified galactan O-antigen type. International Journal of Medical Microbiology, 306(2), 89-98. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.12.002

Tsakris, A.; Tsioni, C.; Pournaras, S.; Polyzos, S.; Maniatis, A. N. & Sofianou, D. (2003). Spread of low-level carbapenem-resistant *Acineto-*

bacter baumannii clones in a tertiary care Greek hospital. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(6), 1046-1047. https://doi.org/10.1093/jac/dkg470

Van Duin, D. y Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence,* 8(4), 460-469. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343

Villegas, M. V.; Lolans, K.; Correa, A.; Suarez, C. J.; Lopez, J. A.;Vallejo, M.; Quinn, J. P. & Colombian Nosocomial Resistance Study Group. (2006). First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(8), 2880-2882. https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06

Woodford, N.; Turton, J. F. y Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 736-755. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x

Yigit, H.; Queenan, A. M.; Anderson, G. J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J. W.; Steward, C. D.; Alberti, S.; Bush, K. & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(4), 1151-1161. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

ACERCA DE LOS AUTORES

Elsa De La Cadena Vivas
https://orcid.org/0000-0003-0361-7893
ecadenav@unbosque.edu.co

Bacterióloga egresada de la Universidad del Valle (1994). Es *MSc.* en Ciencias Biomédicas, graduada de la Universidad del Valle (2017). En el período comprendido entre el año 2009 y 2017 se desempeñó como asistente de investigación del Grupo de Resistencia Bacteriana del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médica (CIDEIM), Cali, Colombia. Actualmente se desempeña como docente investigadora, adscrita a la Vicerrectoría de Investigaciones, Grupo de Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria (RAEH) de la Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Adriana María Correa Bermúdez
https://orcid.org/0000-0003-2024-6975
adriana.corea@usc.edu.co

Bacterióloga, MSc, PhD: Más de diez años de experiencia en investigación en mecanismos de Resistencia Bacteriana y Epidemiología Molecular en bacterias Gram negativas. Lideró el laboratorio de investigación del Grupo de Resistencia Bacteriana en CIDEIM del 2001 al 2018 y actualmente trabaja como profesora asociada en actividades de investigación de la Facultad de Ciencias Básicas en la Universidad Santiago de Cali, en donde continua con la búsqueda de mecanismos de resistencia en el ámbito

ambiental y hospitalario. Está adscrita al Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA). Actualmente, complementa sus actividades de investigación y docencia con la práctica clínica en el Centro Médico Imbanaco, donde se desempeña como asesora del Laboratorio Clínico coordinando las áreas de microbiología y biología molecular.

Ruth Ana Rojas Serrano
https://orcid.org/0000-0002-2619-4021
ruth-ars@hotmail.com

Bióloga egresada de la Universidad Central de Venezuela (2015). Desde el año 2016 y hasta la fecha, se desempeña como personal de investigación en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

Aura Dayana Falco Restrepo
https://orcid.org/0000-0002-8653-4868
aura.falco00@usc.edu.co

Bióloga egresada de la Universidad Central de Venezuela (2003). Es Doctora en Ciencias, mención Microbiología, graduada del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2010). Desde el año 2007, se desempeñó como docente de planta, adscrita al Departamento de Biología Celular, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (2013). En el período comprendido entre el año 2013 y 2016, realizó un postdoctorado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. En el año 2017 fue contratada como profesora con dedicación exclusiva por la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali, Colombia. Durante el año

2018 se desempeñó como directora del programa de Microbiología y en el año 2019 fue ascendida a Profesora Titular en la Institución. Pertenece al Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA).

Carlos Andrés Aranaga Arias
https://orcid.org/0000-0003-1806-657X
carlos.aranaga00@usc.edu.co

Biológo egresado de la Universidad del Tolima (2005). Es *MSc*. en Microbiología, graduado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2011). Seguidamente se desempeñó como Profesional Asociado a la Investigación adscrito al Laboratorio de Genética Molecular, ubicado en el Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela (2013). De forma paralela del año 2008 al 2014, se desempeñó como Docente Temporal en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, mientras que del año 2014 al 2015, como *Medical Science Liason* (Enlace Médico Científico) en Abbott Laboratories (Caracas, Venezuela). Para el año 2016, se desempenó como Interventor para el Programa de Asistencia Técnica Directa Rural del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en Ibagué, Tolima. En el año 2017 fue contratado como profesora de tiempo completo por la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali, Colombia y pertenece al Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO).

Guillermina Alonso
https://orcid.org/0000-0002-1664-7728
guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

Bióloga egresada de la Universidad Central de Venezuela (1980). Es Doctora en Ciencia, mencion Biología Celular, graduada de la Universidad Central de Venezuela (1990). Desde el año 1993, se desempeñó como docente de planta adscrita al Departamento de Biología Celular, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Desde el año 2005 es Profesora Titular. Se desempeñó como directora de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela desde el año 2006 hasta el 2011 y desde el 2018, se desempeña como Coordinadora Académica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Marcela Perenguez Verdugo
https://orcid.org/0000-0002-5751-5211
marcela.perenguez00@usc.edu.co; marcela025@gmail.com

Bacterióloga egresada de la Universidad del Valle (2011). Es Magíster en Ciencias-Biotecnología graduada de la Universidad Icesi (2018). Entre los años 2011 y 2017 se desempeñó como asistente de investigación del Grupo de Resistencia Bacteriana del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médica (CIDEIM), Cali, Colombia. Durante el año 2018 fue contratada para el fortalecimiento de la autoridad sanitaria en la vigilancia en salud pública en el Departamento del Valle del Cauca como parte del equipo del Laboratorio de Biología Molecular.

En el año 2019 se vinculó al Centro Médico Imbanaco en el Laboratorio de Biología Molecular. Actualmente se desempeña en esta institución como coordinadora de la primera Unidad de Medicina Genómica de Colombia complementando sus actividades con la práctica de docencia en la Universidad Santiago de Cali.

PARES EVALUADORES

Clara Viviana Banguero Camacho
Investigador Junior (IJ)
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-4518-6799
Universidad Libre

Viviana Taylor Orozco
Investigador Asociado (I)
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-5369-3942
Fundación Universitaria María Cano. Sede Cali

Carolina Sandoval Cuellar
Investigador Senior (IS)
Orcid: https://orcid.org/0000-0003-1576-4380
Universidad de Boyacá

Ana Isabel García Muñoz
Investigador Junior (IJ)
Orcid: https://orcid.org/0000-0003-4455-4534
Universidad de Boyacá
Centro de Investigación de la Cultura Física (CICFI), de la Escuela Militar de Cadetes General José María Córdova.

Marcela América Roa
Investigador Asociado (I)
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-1481-211X
Universidad de Boyacá

Mildred Alexandra Vianchá Pinzón
Investigador Asociado (I)
Orcid: https://orcid.org/0000-0001-9438-8955
Corporación Universitaria Minuto de Dios

Lucely Obando Cabezas
Investigador Junior (IJ)
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-8770-2966
Universidad Libre

Clara Mercedes Blanco Ospina
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-8640-8175
Unicatólica

Margareth Mejía Genez
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-5142-5813
Instituto de Educación Digital del Estado De Puebla

Kelly Giovanna Muñoz
Orcid: https://orcid.org/0000-0001-7408-6108
UAM-XOC, México.

Claudia Ximena Campo Cañar
Orcid: https://orcid.org/0000-0001-5352-3065
Universidad del Cauca

Alejandro Alzate
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-0832-0223
Universidad Icesi y Universidad Católica

Índice de Figuras

Figura 1. Registro fotográfico de la corrida electroforética horizontal de un gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR de una sección del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S en *A. baumannii*.....48

Figura 2. Registro fotográfico de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$.....49

Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la genotipificación de los aislados de *A. baumannii* provenientes de distintos centros de salud de la ciudad de Caracas empleando rep-PCR.....50

Figura 4. Distribución de los aislamientos resistentes.....75

Figura 5. Expresión de bla_{TEM} *y* bla_{SHV} por RT-qPCR en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.....75

Figura 6. Ajustes realizados para la comparación entre geles de PFGE.....99

Figura 7. Distribución de aislados de *K. pneumoniae* MDR por ciudades.....108

Figura 8. Distribución de aislados de *K. pneumoniae* MDR por tipo de muestra.....108

Figura 9. Distribución de los diferentes ST encontrados en *K. pneumoniae* en Colombia.....112

Figura 10. Diseminación de clones de alto riesgo de *K. pneumoniae* MDR en Colombia.....113

Índice de tablas

Tabla 1. Categoría de antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR en bacterias Gram negativas.....12

Tabla 2. Clasificación molecular de las beta-lactamasas.....18

Tabla 3. Información clínica de los aislados de *A. baumannii* evaluados. 42

Tabla 4. Resultados del perfil de susceptibilidad (mg/l).....73

Tabla 5. Resultados de las pruebas moleculares para TEM, SHV, CTX-M, OXA-1 y KPC.....74

Tabla 6. Cebadores y sondas diseñadas para la detección de genes *bla* por qPCR.....96

Tabla 7. Cebadores y condiciones de amplificación para MLST de *Klebsiella pneumoniae*.....100

Tabla 8. Cebadores y sondas utilizados para la detección del entorno genético de $bla_{KPC.}$.....103

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados para la detección de PCR-replicon typing – PRT.....105

Tabla 10. Resultados de PFGE de *K. pneumoniae*.....109

Tabla 11. Tipificación de aislamientos de *K. pneumoniae* MDR seleccionados para análisis de MLST.....111

Distribución y Comercialización /
Distribution and Marketing
Universidad Santiago de Cali
Publicaciones / Editorial USC
Bloque 7 - Piso 5
Calle 5 No. 62 - 00
Tel: (57+) (2+) 518 3000
Ext. 323 - 324 - 414
✉ editor@usc.edu.co
✉ publica@usc.edu.co
Cali, Valle del Cauca
Colombia

Diagramación / Layout & Design by:
Diana María Mosquera Taramuel
diditaramuel@hotmail.com
diagramacioneditorialusc@usc.edu.co
Cel. 3217563893

Este libro fue diagramado utilizando fuentes tipográficas PT Serif en sus respectivas variaciones a 11 puntos en los títulos y contenido.

Impreso en el mes de febrero de 2021
se imprimieron 100 ejemplares en los
Talleres de SAMAVA EDICIONES E.U.
Popayán - Colombia
Tel: (57+) (2) 8235737
2021

Fue publicado por la Facultad de
Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali.

Los grupos de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA) y en Química y Biotecnología (QUIBIO) hacen parte del Centro de Estudios e Investigaciones en Ciencias Básicas Ambientales y Desarrollo Tecnológico (CICBA), adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali. Desde su comienzo esta unidad académico-administrativa ha procurado estar a la vanguardia en la investigación, en la tecnología y en la innovación. Es por ello que los grupos de investigación acordes con esta macrolínea se han preocupado por compartir sus avances en investigación e innovación en un marco de responsabilidad social. Es por ello que, en este libro llamado "Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas", se recopilan tres trabajos de investigadores que forman parte de la producción intelectual de los grupos GIMIA y QUIBIO, en alianza con el Grupo de Resistencia y Epidemiología Hospitalaria (RAEH) de la Universidad El Bosque. En este libro se dan a conocer estudios realizados tanto en Colombia como en Venezuela sobre la problemática global relacionada con la resistencia bacteriana a una de las familias de antibióticos más usadas en la práctica clínica, los beta-lactámicos.

VIGILADA MINEDUCACIÓN
USC UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
EDITORIAL

ISBN: 978-958-5583-91-7
9 789585 583917